



**PCT**  
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro  
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<b>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> :</b> <b>C12N 15/82, 15/29, C07K 14/415, C12Q 1/68, A01H 5/00</b>	<b>A1</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/12335</b>  <b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:</b> 26. März 1998 (26.03.98)
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/EP97/05130 <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 18. September 1997 (18.09.97)  <b>(30) Prioritätsdaten:</b> 196 37 974.1      18. September 1996 (18.09.96)      DE 197 00 844.5      13. Januar 1997 (13.01.97)      DE  <b>(71)(72) Anmelder und Erfinder:</b> JUNG, Christian [DE/DE]; Zum Amt 15, D-24229 Dänischenhagen (DE).  <b>(72) Erfinder; und</b> <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):</b> KLEINE, Michael [DE/DE]; Fallreep 25, D-24159 Kiel (DE). CAI, Daguang [CN/DE]; Koldingstrasse 11, D-24105 Kiel (DE).  <b>(74) Anwalt:</b> GRÜNECKER, KINKELDEY, STOCKMAIR & SCHWANHÄUSSER; Maximilianstrasse 58, D-80538 München (DE).		<b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> CZ, EE, HU, JP, LT, LV, PL, RU, SI, UA, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  <b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>
<b>(54) Title:</b> NEMATODE-RESISTANT GENE		
<b>(54) Bezeichnung:</b> NEMATODENRESISTENZGEN		
<b>(57) Abstract</b>  The invention concerns a nucleic acid that induces resistance to sedentary nematodes in plants of the solanaceae, chenopodiaceae and/or brassicaceae family. Said nucleic acid comprises specially a translated area, that is at least 60 % homologous to the sequence of the Hsl <sup>pro-1</sup> -gene of <u>beta procumbens</u> . The invention also covers the sequence of a cDNA clone and a genomic clone of said nucleic acid. Moreover, it covers a vector, which can be, for instance, a yeast artificial chromosome "YAC", containing the nucleic acid for resistance to sedentary nematodes in plants. The invention also relates to the use of the nucleic acid or the vector to induce resistance to sedentary nematodes in plants as well as a transgenic plant containing the nucleic acid or the vector. In addition, the invention concerns the protein coded by the nucleic acid, a test kit containing the nucleic acid and/or the vector and a method for a transgenic plant as well as a method for producing a nematode resistance in plants. Lastly, the invention also concerns the promoter of the nucleic acid, its use and a primer for the PCR.		
<b>(57) Zusammenfassung</b>  Die vorliegende Erfindung betrifft eine Nukleinsäure, die eine Resistenz gegen sedentäre Nematoden in Pflanzen der Familien der Solanaceae, Chenopodiaceae und/oder Brassicaceae induziert. Insbesondere umfaßt diese Nukleinsäure eine translatierte Region, die zu mindestens 60 % zu der Sequenz des Hsl <sup>pro-1</sup> -Gen aus <u>Beta procumbens</u> homolog ist. Die vorliegende Erfindung betrifft außerdem die Sequenz eines cDNA-Klons und eines genomischen Klons dieser Nukleinsäure. Ferner betrifft die vorliegende Erfindung einen Vektor, der z.B. ein künstliches Hefechromosom (yeast artificial chromosome) "YAC" sein kann, der die Nukleinsäure für eine Resistenz gegen sedentäre Nematoden in Pflanzen enthält. Schließlich betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung der Nukleinsäure oder des Vektors zur Induktion einer Resistenz gegen sedentäre Nematoden in Pflanzen sowie eine transgene Pflanze, die die Nukleinsäure oder den Vektor enthält. Ferner betrifft die Erfindung das durch die Nukleinsäure kodierte Protein, einen die Nukleinsäure und/oder den Vektor enthaltenden Testkit und ein Verfahren einer transgenen Pflanze sowie ein Verfahren zum Erzeugen einer Nematodenresistenz in Pflanzen. Schließlich betrifft die Erfindung den Promotor der Nukleinsäure, seine Verwendung und einen Primer für die PCR.		

# **LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

## Nematodenresistenzgen

Die vorliegende Erfindung betrifft eine Nukleinsäure, die in Pflanzen, vorzugsweise der Familien der Solanaceen und/oder Chenopodiaceen und/oder der Brassicaceen, besonders bevorzugt der Gattung Beta und/oder Brassica und/oder Solanum, eine Resistenz gegen sedentäre Nematoden induziert.

Die vorliegende Erfindung betrifft außerdem die DNA-Sequenz eines cDNA-Klons und eines genomischen Klons dieser Nukleinsäure. Ferner betrifft die vorliegende Erfindung einen Vektor, der z.B. ein künstliches Hefechromosom (yeast artificial chromosome) "YAC" sein kann, der die Nukleinsäure für eine Resistenz gegen sedentäre Nematoden in Pflanzen enthält. Schließlich betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung der Nukleinsäure oder des Vektors zur Induktion einer Resistenz gegen sedentäre Nematoden in Pflanzen sowie eine transgene Pflanze, die die Nukleinsäure oder den Vektor enthält.

Ferner betrifft die Erfindung das durch die Nukleinsäure kodierte Protein, einen die Nukleinsäure und/oder den Vektor enthaltenden Testkit und ein Verfahren einer transgenen Pflanze sowie ein Verfahren zum Erzeugen einer Nematodenresistenz in Pflanzen.

Schließlich betrifft die Erfindung den Promotor des Resistenzgens.

Es ist bekannt, daß Pflanzen von verschiedenen Erregern und Parasitenarten befallen werden. Es ist ebenfalls bekannt, daß Kulturpflanzen meist anfälliger sind für einen Parasitenbefall als ihre wildwachsenden Verwandten. Häufig trifft man Pflanzenparasiten aus der Familie der Nematoden an, mit einer Flüssigkeits-erfüllten, von einem Hautmuskelschlauch umschlossenen Pseudocylomhülle. Nematoden sind wichtige Pa-

rasiten, die in den Ernten überall auf der Welt einen Schaden von ca. 150 Millionen DM pro Jahr verursachen. Besonders schädlich sind Nematoden der Gattungen *Meloidogyne*, *Heterodera* und *Globodera*, die sich permanent in den Wurzeln der befallenen Pflanze festsetzen, nachdem sie bestimmte Ernährungsstrukturen induziert haben. Der Nematode *Heterodera schachtii* hat ein breites Wirtsspektrum, das viele Arten verschiedener Pflanzenfamilien umfaßt, z.B. die Chenopodiaceae und Brassicaceae.

Der Lebenszyklus von Nematoden ist in vier larvale Stadien untergliedert (J1-J4). Die Wurzeln werden von J2 Juvenilstadien infiziert, die zum Zentralzylinder wandern, wo sie die Entwicklung von Syncytien induzieren. Diese extensiven Nahrungsstrukturen resultieren aus einem teilweisen Zellwandabbau zwischen den Zellen des Xylem-Parenchyms. Der Nematode beendet seinen Lebenszyklus zum Erwachsenen nach drei Abschnitten. Die weiblichen Nematoden schwellen an und zerstören schließlich den Wurzelcortex, während sie sich immer noch aus den Syncytien ernähren. Die männlichen Stadien ernähren sich nach Beendigung des dritten Stadiums nicht mehr und bewegen sich, wenn sie erwachsen sind, auf die weiblichen Stadien zu, von denen sie durch Sexpheromone angezogen werden. Die reifen weiblichen Stadien sind mit Eiern angefüllt. Nach ihrem Tod formen sie eine Zyste, in der die infektiösen Larven (J2) in der Erde für bis zu 10 Jahre überleben können.

Es wird angenommen, daß Nematodenresistenzgene eine inkompatible Reaktion zwischen dem Wirt und dem Parasiten auslösen, die auf zellulärem Niveau bereits beschrieben wurden. Die Wurzeln von Pflanzen, die dieses bzw. diese Gen(e) tragen, werden von J2-Juvenilstadien zwar befallen, aber die meisten der Nematoden sterben im späten J2-Stadium aufgrund des Abbaus des initiierten Syncytiums. In seltenen Fällen können

sich weibliche Stadien entwickeln, die jedoch ein durchsichtiges Aussehen zeigen und ihr Wachstum einstellen. Auf diese Weise können die Nematoden ihren Lebenszyklus nicht vollenden.

Da der Einsatz von Nematiziden aufgrund umweltpolitischer Überlegungen nur begrenzt möglich ist, ist es besonders wünschenswert, diese Resistenzgene auch in Kulturpflanzen zu verwirklichen.

Insbesondere Kulturrüben der Gattung Beta (z.B. Zuckerrübe, Futterrübe, Mangold, Rote-Bete) sind hochanfällig gegen den Rübenzystennematoden Heterodera schachtii. Es wird bereits seit langem daran gearbeitet, Resistenzen gegen Heterodera schachtii und andere phytopathogene Nematoden (z.B. Globodera) in Pflanzen, insbesondere Kulturpflanzen, zu erzeugen, da diesen entsprechende Resistenzgene fehlen. Einzige Quellen für eine Resistenz sind die Wildart Beta procumbens und ihre nahen Verwandten B. webbiana und B. patellaris.

Gene für die Resistenz gegen verschiedene Nematodenarten werden in unterschiedlichen Nutzpflanzenarten züchterisch genutzt (z.B. Kartoffel, Tomate, Weizen, Ölrettich). Es wurde auch ein Resistenzgen aus der Wildart Beta procumbens mittels Artkreuzung in die Zuckerrübe überführt. Daraus konnten resistente Zuckerrüben selektiert werden, die jedoch den Nachteil aufwiesen, daß sie durch mangelnde Qualitäts- und Leistungseigenschaften charakterisiert waren. Die resistenten Zuckerrübenlinien, die aus der Artkreuzung mit Beta procumbens hervorgingen, verfügen über wechselnd große Translokationen aus den Wildrüben der Sektion Procumbentes. Ihre geringe Leistungsfähigkeit und verminderte Qualität liegt vermutlich darin begründet, daß sich neben dem Resistenzgen noch weitere leistungsmindernde Gene aus den Wildarten in diesen Zuckerrübenlinien befinden. Auch ist die

Transmission der Resistenzeigenschaft auf nachfolgende Generationen unvollständig. Auf rein züchterischem Wege lassen sich diese Nachteile nicht beseitigen, da eine Züchtung durch Kreuzung kaum spezifische Eigenschaften selektieren kann, ohne daß auch andere - unter Umständen nachteilige - Eigenschaften mitübertragen werden.

Weiterhin wurden zahlreiche Versuche unternommen, um künstliche Nematodenresistenz in Pflanzen durch eine Kombination von "Selbstmordgenen" mit Syncytien-spezifischen Promotoren zu induzieren. Bislang konnten daraus jedoch keine resistenten Pflanzen gezüchtet werden.

Es ist außerdem bisher noch nicht gelungen, ein natürliches Resistenzgen molekular zu identifizieren und für die Erzeugung einer Resistenz in Kulturpflanzen zu nutzen.

Es war daher eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, eine Nukleinsäure bereitzustellen, die eine Resistenz gegen Nematoden in Pflanzen vermittelt. Es war eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung, die diesem Gen zugrunde liegende DNA-Sequenz bereitzustellen.

Ferner war es eine weitere Aufgabe gemäß der vorliegenden Erfindung, die Verwendung eines solchen Gens zur Induktion einer Resistenz gegen sedentäre Nematoden zu ermöglichen.

Es war außerdem eine Aufgabe gemäß der vorliegenden Erfindung, eine transgene Pflanze anzugeben, die eine solche Resistenz vermittelnde Nukleinsäure enthält, sowie Zellen, Samen oder Pflanzenteile, die diese Nukleinsäure enthalten.

Schließlich war es eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, Vektoren anzugeben, in die das Gen zur Resistenzvermittlung

gegen Nematoden in Pflanzen wirksam eingebaut werden kann und darin enthalten ist.

Es war weiterhin eine Aufgabe gemäß der vorliegenden Erfindung, das von der Nukleinsäure kodierte Protein und einen Testkit, der die Nukleinsäure enthält, anzugeben.

Schließlich war es eine Aufgabe gemäß der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren zur Herstellung einer transgenen Pflanze und ein Verfahren zum Erzeugen einer Resistenz gegen Nematoden anzugeben.

Es war auch eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, den Promotor anzugeben, der die Expression des oben angegebenen Resistenzgens kontrolliert.

Diese Aufgaben werden durch die in den Ansprüchen angegebenen Gegenstände der Erfindung gelöst.

Figur 1 zeigt eine Northern-Analyse von Gesamt-RNA aus Blättern und Wurzeln. Die Gesamt-RNA wurde aus Blättern und Wurzeln von sechs Wochen alten Pflanzen isoliert, die entweder (1) infiziert oder (2) nicht infiziert waren. Die Vollängen-cDNA 1832 wurde als Sonde verwendet. 20 µg Gesamt-RNA wurden in 1,3 %iger Agarose aufgetrennt und auf Nylonmembranen transferiert. Der Filter wurde über Nacht mit der radioaktiv markierten Sonde bei 60°C hybridisiert und anschließend für 2 x 30 min bei 60°C in 0,2 x SSC gewaschen.

Gemäß Anspruch 1 der vorliegenden Erfindung wird eine Nukleinsäure, die in Pflanzen, vorzugsweise aus der Familie der Solanaceae und/oder Chenopodiaceae und/oder Brassicaceae, besonders bevorzugt der Gattung Beta und/oder Brassica und/oder Solanum eine Resistenz gegen sedentäre Nematoden induziert, bereitgestellt. Die Bereitstellung eines sol-

chen Gens erlaubt es, Kulturpflanzen zu züchten, die eine Resistenz gegen sedentäre Nematoden aufweisen. Derartig resistente Kulturpflanzen sind selbstverständlich ihren nicht resistenten Verwandten weit überlegen, da sie nicht von Nematoden befallen werden können und daher weniger krankheitsanfällig sind. Durch die Bereitstellung der Nukleinsäure, die die Resistenz gegen sedentäre Nematoden in Pflanzen trägt, ist es weiterhin möglich, resistente Pflanzen zu erhalten, die dennoch eine gleichhohe Qualität und Leistungsfähigkeit wie andere, nicht resistente Kulturpflanzen aufweisen. Dies ist darauf zurückzuführen, daß eine einzelne Nukleinsäure, nämlich die Nukleinsäure für die Resistenz gegen sedentäre Nematoden, in die Pflanzen übertragen wird, während bei konventionellen Züchtungsverfahren neben den gewünschten Genen auch andere DNA-Sequenzen übertragen werden, die unter Umständen für unerwünschte Eigenschaften kodieren.

Besonders bevorzugt umfaßt die Nukleinsäure, die die Resistenz gegen sedentäre Nematoden induziert, einen translatierten Bereich, der zu der Sequenz des Hs1<sup>pro-1</sup>-Gens aus Beta procumbens mindestens 60 % homolog ist. Hierzu zählen unter anderem die homologen Gene aus Beta webbiana und Beta patellaris. Das Hs1<sup>pro-1</sup>-Gen aus Beta procumbens trägt eine Resistenz gegen sedentäre Nematoden in Pflanzen. Eine 60%ige Homologie mit der oben aufgeführten DNA-Sequenz ist bereits ausreichend, um die gewünschte Eigenschaft der Resistenz gegen sedentäre Nematoden in einer Pflanze zu induzieren, die diese Nukleinsäure trägt. Erfindungsgemäße Gene sind ebenfalls erhältlich durch Absuchen von Genbanken mit der Sequenz 1832, wobei die Hybridisierungsbedingungen wie folgt gewählt werden können:

Hybridisierungstemperatur 50°C, vorzugsweise 60°C, und Waschen der Filter in 0,5 x SSC, vorzugsweise in 0,2 x SSC für beispielsweise 30 Minuten.



Besonders bevorzugt ist die Nukleinsäure, die eine Resistenz gegen sedentäre Nematoden in Pflanzen induziert, die folgende DNA-Sequenz umfaßt:

```

ATGAGAAGGT
GTGGGTATAG TTTGGGCCTT GGTGAGCCCA ATTTGGACGG AAAGCCCAAT
TTAGATTACG ACGCCGTTTG TCGTCCTTCT GAGCTTCACG CGCTTAAAAA
GGGCGCGTTG GATTATATTC AGAATTCGGA AAATCAGATA TTGTTTACAA
TTCATCAGAT TTTCGAGTCG TGGATTTTTT CCTCGAAAAA ATTGTTGGAT
CGAATAAGTG AGAGGATCAG TAAAGAAGAG TTTACCAAAG CAGCAGATGA
TTGTTGGATA CTGGAGAAAA TATGGAAGTT ATTGGAGGAA ATCGAGAATT
TACATTTATT AATGGATCCT GACGATTTC TGCATCTGAA GACGCAACTG
AGGATGAAAA CAGTGGCGGA TTCTGAAACT TTTTGTTTTT GATCAAAAGG
ACTGATCGAG GTAACAAAAT TAAGCAAGGA TCTACGGCAC AAGGTGCCGA
AGATCCTTGG TGTAGAGGTG GACCCTATGG GAGGACCGGT GATACAAGAG
TCGGCAATGG AGTTGTACCG AGAAAAAGA AGATACGAGA AGATACATCT
GTTACAAGCG TTTCAAGGGG TGGAAATCCGC TGTTAAAGGG TTTTCTTTA
ATTATAAACA GTTGTGTTGGT ATCATGATGG GTAGTTTGGA AGCGAAAGCG
AATTTTGCTG TGATTGGTGG TTCTACTGAG TCTTCGGATT TGTGGCTCA
GTTGTTTTTA GAACCTACTT ATTATCCGAG TTTGGATGGT GCCAAGACTT
TTATTGGTGA TTGTTGGGAG CATGATCAGG CTGTTGGTAG CGGCCTCGAT
TGTCGTCATC ATCGGAAGAA TCGGACTGCG AAACAATGA

```

Diese Sequenz soll im folgenden als Nr. 1832 bezeichnet werden.

Ebenfalls von der vorliegenden Erfindung umfaßt sind Nukleinsäuren, die ein Protein kodieren, das die gleiche Nematodenresistenz verleiht, wie das durch obige Nukleinsäure Nr. 1832 kodierte Genprodukt, wobei vorzugsweise alle diese Genprodukte die gleiche Aminosäuresequenz umfassen.

Vorzugsweise ist die Nukleinsäure eine cDNA.

In einer weiteren Ausführungsform ist die Nukleinsäure, die die Resistenz gegen sedentäre Nematoden in Pflanzen induziert, eine genomische DNA, die die folgende DNA-Sequenz umfaßt:

```

TCTAGAGCTG TCGACGCGGC CGCGGAATTA ACCCTCACTA AAGGGAACGA
ATTCGGATCT TCTTTCTTGG TGCTTAATTT TTTGACACTA ATCCGATTCT

```

TAGCATTAAAG	TTGAAGCACA	CTCTTGATAA	ACTATGTTAC	TATGTATCAT
TGTC AATATG	CTAAGAATTT	GTCTTGACCT	CATCGCTATG	TATAAGCATC
TAATACTTTC	CTAAACTAGT	AAAAACAAAT	ATTCCATCCG	TCCCATAATA
TGAGTCCCTT	TTCTATTTTA	GGAGTCAAAA	TTTTAAAATT	TTTGACCAAA
TATTCTTATT	ACTATATATA	AAAACATATT	CATGTGGGAT	CTTGTTAGAT
TCGTCTTAAT	ATGTATTTTC	ATAATATCAA	CTTTTTATAT	TTTTTTACTA
ATACGAAAT	GAAGATATAC	AATGTCTTAA	AGACTATGCA	AAAGTAAGCA
GAACCTATAT	TTTGGGACGG	AGGGAGTAAT	AAGTAATATT	GATTGACGCA
TAATTTGTAT	ATAAATATTT	CAAATTGATA	CTACTTTAAA	TAATATAGTT
AATGCTTATA	AATAAGCCTA	AAGACTGTGA	ATAGCAAGAT	CGTTAAAAAT
AAAATTTGAA	AATATTGAT	ATGGATAATG	AAATTGGAAA	TGGCATGCTT
AGCTTCTCGG	GAATCTTATA	CCGCTACATC	TATAATAAAA	ATTCCTCATA
AAATTTTGCC	CATTTTAACA	CACGAAATTC	GTCTTTTAC	GCGAGCCCTT
TCCACACGTC	TTTAAAAATTT	AAAAACCTCG	TCTTTACTCT	CCCCACCTAT
ATATATACAC	GTCCCCCTT	CTCTACTTCC	CATCTCACAT	ACACATACCC
AATCCACAAA	CTTCCATCTT	ATCCAACCTT	CTCTCACCTA	TCTCCTTCTT
CAATTTTCAA	AACTCAAAAG	AAAATGGTAG	ATTTTCGATTG	CAAAACAAAA
ATGGTACAAT	CAACACCAAA	CCTCACAAAA	AAATCTCCAA	AAATCACAAC
CAAACGCACA	ATATCAACAC	CATTAATTTT	ACCAGTACCA	GTAATTTCCG
GCGAATTATC	TCCGGCGTCG	GAATCATCCT	GTTTCAGCTTA	CGAATCGTAT
CTCAAATTAC	CGGAGCTCCG	TCAACTATGG	AGTTCAAAAG	AATTCCCCGG
TTGGGATAAC	GAACCGATAA	TCAAACCGGC	TTTGCAAGCA	TTAGAGATAA
CATTCCGGTT	CATCTCACTC	GTTTTATCCG	ACGCTAGACC	GTACATAAAC
CGGCGAGAAT	GGAACCGGAA	ATTAGAGTCG	TTAGCGAGAG	ATCAAGTCCG
AAACTCATCT	CAGTTCTCTG	CGGAAGACGA	TGAGACACGT	GGATCAGCTC
CGAATCGTTG	ATCTGACGTC	ATCGTATGGT	GAGGTGATGT	CACAAACAGA
AGTTCAGCGG	AGGTATGGAA	GCTTGCGAAT	GGAGAACATG	ATACTACCGT
GGTCTGTCTG	AGTAGCGAAT	TTAGTCTCCT	TCCGAGGTTA	GCCACGTGGC
AGAAGTCGGA	GGAGATTGCT	TCTAGAATCT	TCTACGCGGT	TGAATCTGCT
ATGAGAAGGT	GTGGGTATAG	TTTGGGCCTT	GGTGAGCCCA	ATTTGGACGG
AAAGCCCAAT	TTAGATTACG	ACGCCGTTTG	TCGTCCTTCT	GAGCTTCACG
CGCTTAAAAA	GGGCGCGTTG	GATTATATTC	AGAATTCGGA	AAATCAGATA
TTGTTTACAA	TTCATCAGAT	TTTCGAGTCG	TGGATTTTTT	CCTCGAAAAA
ATTGTTGGAT	CGAATAAGTG	AGAGGATCAG	TAAAGAAGAG	TTTACCNAAG
CAGCAGATGA	TTGTTGGATA	CTGGAGAAAA	TATGGAAGTT	ATTGGAGGAA
ATCGAGAATT	TACATTTATT	AATGGATCCT	GACGATTTCC	TGCATCTGAA
GACGCAACTG	AGGATGAAAA	CAGTGGCGGA	TTCTGAAACT	TTTTGTTTTC
GATCAAAAGG	ACTGATCGAG	GTAACAAAAT	TAAGCAAGGA	TCTACGGCAC
AAGGTGCCGA	AGATCCTTGG	TGTAGAGGTG	GACCCTATGG	GAGGACCGGT
GATACAAGAG	TCGGCAATGG	AGTTGTACCG	AGAAAAAGA	AGATACGAGA
AGATACATCT	GTTACAAGCG	TTTCAAGGGG	TGGAATCCGC	TGTTAAAGGG
TTTTTCTTTA	ATTATAAACA	GTTGTTGGTG	ATCATGATGG	GTAGTTTGGA
AGCGAAAGCG	AATTTTGCTG	TGATTGGTGG	TTCTACTGAG	TCTTCGGATT
TGTTGGCTCA	GTTGTTTTTA	GAACCTACTT	ATTATCCGAG	TTTGGATGGT
GCCAAGACTT	TTATTGGTGA	TTGTTGGGAG	CATGATCAGG	CTGTTGGTAG
CGGCCTCGAT	TGTCGTCATC	ATCGGAAGAA	TCGGACTGCG	AAACAATGAT
GGTTTCGAAG	TTAGTTTTTG	ATTGAGTTTG	GTTTGATCTG	ACTCGGCTGA
GTAATGGGCG	GCGATAGGGA	GGTTATGGAG	AACGTGGGGC	GGAAAGTGGG
TGGCCTTGTT	AGTGAGACGT	GCAAACTTTG	GTTACTATTA	CATGTGATAT
ACTTATATTT	AGTGGGAATA	TTGCTTTGGT	GTATATAGAT	AAATTTTGA
ATTAATTGTT	ACACTTGTAT	TAGTAAATTC	TGTATCATGA	TGATTATAAC
ATGAATTTTT	TGTTGTGACT	TTAAATGAGA	TTTATGCTCC	TTAATCCTTA
TTTCACTGAT	ATTATTTTTT	TGTAGTCTGA	GTATAAGTGC	GGAGTTTAAT

CAAGCAAGAG AAAATAATAG AAGGTGATTG CATACTTGGA TTGGAGATCA  
 ATATCTAAAA GATGGTTATG AAACCTATTGT GAATAACGGA GTACATGTCC  
 AACACCACAC ACGTATGACT GTGTACCTCT AATTTACAAA GAGATTTACA  
 AAATCTAGAT GAGTTTTGAT ATGATCGACA TTGTCTCTAA ATGGGAGATA  
 AGAATTAAAT CGTGAGGCTC TTTGCGGCTA G?TCTTCCGA ATAAAATAAG  
 AAACAATGGT TTACTCTAAT TCA?TTTTCC AATTGGCAAA GTGGCACAAG  
 CTTCAATAA? T?GGCTCTTC ACAATTGAGT ATAAAAGAAT GGGTTAATTA  
 C?CCGG?CTT TGAATAAAAT TAATCCTATT TAATTGTTTT TGAAATATTC  
 TTAAAAATA? CGTTGTCTAA TACTTTCTTT AGTTGGGACC CGGTTCTGAA  
 CC?ACTTAAA TTAATGGGCT CAATGGCCGC CTAATTTCCT CTGTGTATTT  
 TTAGCCTTTT TTTTCCTTTT TTTCCCTTTA AAATAACTAT TTGTCTCTCT  
 GAATATCTTA AAATACGTGT CTATC??CTT TAGTTGGACC GTCTGAACCTA  
 TTATTATGCT ATGCACTATT CCTTTGTATT TACCTTTTTT TTTTTCTTTT  
 AAATACTATT GTTCTCATTT CAATTATATT CTATTTTTGT TAAAAAACGG  
 TCTTAATTTT TACAACAGTA AAATTATTGA TTTTCCTTCT ATATTAAAAT  
 TTGAAAGTGA ATGTATTTTCG AAATTTAGGT ATATGAATAT TTATATTGTT  
 CGATTAATGA TGATAAAAGG ATTTTACTCA TTAACCTAAA CCATTTCTAG  
 ATAAGATAAG AGGAACTTCC ACCTAGTTAA CATGTCTCAC TTTCTAGTA  
 GACGAATCTA AATTGCGTTG CTGGATTTAG AACTTTGGTC AAGATAATGG  
 CAAAACCTTC AAGCACCCGT AGATGCATTT TCC?CGACAT TTCTCATACA  
 GCACTAAACG TTTCAACTTC CTCTTTTATT TTCTTGAAAT TTTTGTGGC  
 AATGAGAAAC GTTCGAAGTT GATCTTTGCG TTTGACGAT TTGAAATAAG  
 AAAATGCGTA TTGTCGGCAA CTGATTGTAG TAGTTGC?GT TATTATAATG  
 ATAGTCTTTT ATATAGAATT CATTTAATTC TAATTCATTT GAATCCAGTT  
 AAGTTGAGTT TAGTTTAGTC AGCCTAAAAG AACAAAGTAA GTCATGGAAT  
 GGAATGAAGA TGTAATCAAA TAGAGGAGGG GCTGATAACA ATAATTATTA  
 CTTATGTTGC GTGTTCAATT CAGTAATGAA AAAAATAAGG TTGAATTAGG  
 AGGGTAATAC AATTATTACC GGTGATGTGA TAAAACTAAT GTTTAAGGGT  
 TTAAGTTACT CTAAACCCTC AATTAAACAT AGTCTAACAA AAAATTCCTCA  
 TAATCTAAAT CAAACACGTA CTTATACAAT CCTCTACATG AATCCGTTTC  
 TAACTCTAAA GGAAGATCGA TACTTATTAG AATCCGTTTC CAACCCTAAA  
 AATGACTGAT CAAAGGTTCA TGGATTTTGG AAGGGAAAGA CGAATGCGAG  
 GGCAGTGTAC AGGATAATGT GCATGAGATG GCAAGGGTCA TGCTAGTTAG  
 AGCAAAATAT A?ATGACTTA ATTCAAAAAC TACCTACTAT TTCAAATTAA  
 TAGACTTTTAT TGGAGTCATG AAGTGACTG TTTGGTACAC CCCACATTAC  
 TCATGCACTA CACCTAATTT GTCACAGCAT TCAGCTGCCC TTGTTTTGCA  
 GTCTTTGGAG CTGGCGTGCC TCTTGTTGCT GGTAGTCGG CGCTTGGTCT  
 GTTGTG??GT GACCCTCTGT TTTTTTTTTT TTTTAAAATG GTCGCTGATT  
 ACTAT?CTGT GTATT?CATT TTGTACTCCC TCGTATCCAA TTATATGCTA  
 CACTTTTTTT GCGGACTCCA AAACGTTTTT TTTTT?TGTC CGAGAGATAG  
 AGAGGAAAAG CCCATGTTGT TAGGAGAGAG ?TCGGGAGAA GGAAAAGCCA  
 AATAAAGAAG TAATAACATC TAAATAAGAA AATTCCTTTG ATGGAAAGTG  
 TAGCGACTAA AAAACGAAGG ACAATATGTA GTTTTCATAT GCCTTTACCT  
 TTGCAATCTC CTTTTTTTATT GTTTACCCAT ACTGGATTAG GTTGGATTTA  
 TCAACACAAA ATGAGTTGGA CTATATCACT ACATTACTGT GGTCCGTGCG  
 ATACATCAAC AAAAAAATG AGTTGGACCA TATCAATGTG TTAGCGTGGA  
 TTATGTACAC ATTGGACTGG AGTTGAAGCA AATATAATCT GAAAAGGGCG  
 ATGGGTTAGG TCATGAGGTA TTTAGAATAA GACTTTGATC AAGCCCAAAT  
 CCACCCGCAA AGAATTATAC CCTTTATTTT CAAGGCACCA TCACTGCATA  
 AAATAATCTG AAATGCCACA AAAGATTAAC GTCCAATATG CTCACAGCCA  
 AAAATCAATC CATTATTGTT TGGTAAGAAA AGGTAATAGG CTAGATCAAT  
 TTGCTGCCAA TTGCCAGGCC TGTGGGCCCTG TCACCTGTGG GTAATTTAAT  
 ATG?CTCAA TGGGTCGGCC TGTTAAGTAC ACCAACATGA ACTTAAAGCT T

An Positionen mit (?) kann sich A, G, C oder T befinden oder das Nukleotid ist nicht vorhanden. Der Translationsstart ist unterstrichen. Die fettgedruckten Buchstaben stellen den cDNA-Anteil dar. In dem beigefügten Sequenzprotokoll entspricht (?) dem Buchstaben N.

Diese Sequenz soll im folgenden als Nr. 1832.1 bezeichnet werden. Die ursprüngliche Sequenz von 5407 Nukleotiden, wie in Figur 2 angegeben, enthielt Sequenzierfehler, die sich jedoch nicht auf den proteinkodierenden Bereich auswirken.

Schließlich umfaßt die vorliegende Erfindung die Sequenz gemäß dem Seq.Id.No3. (auch als 1832A1 bezeichnet).

Umfaßt ist auch eine Nukleinsäure, die erhältlich ist durch Absuchen einer DNA-Bank mit einer wie oben beschriebenen DNA-Sequenz und die für eine Nematodenresistenz kodiert, wie für Klon 1832 nachgewiesen.

Vorzugsweise stammt die Nukleinsäure aus einer Wildart der Sektion Procumbentes der Gattung Beta.

Besonders bevorzugt löst die Nukleinsäure, wie oben beschrieben, eine Resistenz gegen sedentäre Nematoden der Gattungen Meloidogyne, Heterodera und/oder Globodera aus. Ganz besonders bevorzugt ist die Induktion einer Resistenz gegen Heterodera schachtii in Pflanzen. Besonders bevorzugt wird die Resistenz gegen sedentäre Nematoden in Pflanzen der Art Beta vulgaris induziert.

Bei der Einschleusung eines derartigen Gens in die zu verändernden Pflanzen wird in aller Regel lediglich die Eigenschaft Nematodenresistenz beeinflusst. Es sind keine pleiotropen Geneffekte zu erwarten. Damit bleibt die Leistungsfähigkeit des Zuchtmaterials unberührt. Die transgenen Pflanzen, die das o.g. Gen exprimieren, zeigen eine inkompatible Reaktion gegenüber Zystennematoden. Damit können sie für die

Züchtung resistenter Sorten eingesetzt werden. Da es sich um eine natürliche Resistenz-Nukleinsäure aus Wildarten der Sektion Procumbentes der Gattung Beta handelt, werden keine Akzeptanzprobleme hinsichtlich gentechnisch veränderter Pflanzen erwartet. Nematodenresistente Sorten, die das oben genannte Gen besitzen, können zu einer Erhöhung des Anteils von Wirtskulturen in der Fruchtfolge führen. Im Falle der Zuckerrübe bedeutet das theoretisch, daß eine Kultur mit hohem Deckungsbeitrag in verstärktem Maß angebaut werden kann. Ferner ist die HS1<sup>pro-1</sup>-Sequenz nicht nur in Pflanzen der Gattung Beta aktiv, sondern sie vermag auch eine Nematodenresistenz in Pflanzen anderer Gattungen, wie beispielsweise in Arabidopsis thaliana, zu erzeugen.

Ob eine aufgefundene Sequenz das Potential besitzt, einer Pflanze Nematodenresistenz zu verleihen, läßt sich anhand üblicher Tests überprüfen, wie sie beispielsweise im folgenden noch näher erläutert werden.

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird ein Vektor, besonders bevorzugt ein künstliches Hefechromosom, zur Verfügung gestellt (yeast artificial chromosome, YAC), das eine Resistenz gegen sedentäre Nematoden in Pflanzen vermittelt und die Nukleinsäure, wie oben beschrieben, enthält.

Das YAC kann z.B. folgende DNA-Sequenz enthalten:

1. (Nr. 1832)
2. (Nr. 1832.1)

Eine 60%-ige Homologie zu der in den YACs enthaltenen Nukleinsäuren genügt zur Induktion einer Resistenz in den Pflanzen.

Bevorzugte YACs sind die folgenden:

TABELLE 1

YAC	Größe in kbp	Spezifität	klonierte Sequenzen der YAC-Enden	
			links	rechts
YAC42D12	50	643	-	+
YAC112G9	60	643	+	+
YAC120E7	150	643	+	+
YAC31G11	70	D13	+	+
YAC80G3	200	YAC31L	-	+
YAC116C5	50	YAC31R	-	-
YAC114H8	120	YAC104L	-	-

In einer bevorzugten Ausführungsform wird eine Resistenz gegen Nematoden der Gattungen Meloidogyne, Heterodera und/oder Globodera in Pflanzen induziert. Besonders bevorzugt richtet sich die Resistenz gegen Heterodera schachtii.

Vorzugsweise wird die Resistenz gegen sedentäre Nematoden in Pflanzen der Art Beta vulgaris induziert.

Weiterhin richtet sich die Erfindung auf die Verwendung der Nukleinsäure oder des Vektors, wie oben beschrieben, zur Induktion einer Resistenz gegen sedentäre Nematoden in Pflanzen.

Die Erfindung ist außerdem auf eine transgene Pflanze gerichtet, die die Nukleinsäure oder den Vektor, wie oben beschrieben, enthält.

Das Gen kann durch Transformation mit Standardmethoden entweder unter der Kontrolle eines konstitutiven Promotors oder unter der Kontrolle des internen Promotors, der stromaufwärts der translatierten Sequenz liegt, in Pflanzen zur Ex-

pression gebracht werden. Dadurch wird eine inkompatible Reaktion mit den sedentären Nematoden, insbesondere dem Zysten-nematoden Heterodera schachtii, hervorgerufen.

Die stromaufwärts gelegene, ca. 1500 Nukleotide umfassende Promotorregion des Gens kann zur wurzelspezifischen Expression beliebiger Gene in beliebigen Pflanzen verwendet werden. Umfaßt sind Promotoren, die sich von der 5' nicht translatierten Region des  $HS1^{pro-1}$ -Gens ableiten und die gleiche Promotoraktivität zeigen wie der  $HS1^{pro-1}$ -Genpromotor.

Ein bevorzugter Promotor befindet sich innerhalb des XbaI-Fragments zwischen Nukleotidposition 1 und 1521 in der Sequenz 1832.1. Weiterhin bevorzugt sind Promotoren, die sich von dem genannten Promotor durch z.B. Insertionen, Deletionen, Substitutionen und/oder Inversionen ableiten und die gleiche Promotoraktivität beibehalten oder sogar stärkere Promotoraktivität zeigen. Das Vorhandensein von Promotoraktivität läßt sich mit den üblichen Verfahren bestimmen, wie beispielsweise im folgenden anhand der Beispiele erläutert.

Als erfindungsgemäß werden Derivate des oben genannten 1832-Promotors angesehen, die mindestens 10 % von dessen Promotorstärke aufweisen.

So wird der 1832-Promotor beispielsweise in Arabidopsis thaliana aktiviert mit dem Ergebnis, daß die Sequenz 1832 unter der Kontrolle des genannten Promotors in diesem Wirt eine Resistenz gegen Heterodera schachtii hervorruft.

In einer bevorzugten Ausführungsform gehört die transgene Pflanze der Gattung Beta oder der Gattung Brassica an. Besonders bevorzugt gehört die transgene Pflanze der Art Beta vulgaris an.

Die Erfindung ist auch auf Zellen, Samen oder Pflanzenteile gerichtet, die die Nukleinsäure oder den Vektor, wie oben beschrieben, enthalten.

Ferner ist die Erfindung auf das von der Nukleinsäure kodierte Protein gerichtet, sowie auf Derivate davon mit den gleichen resistenzverleihenden Eigenschaften.

Die erfindungsgemäßen Proteine sind erhältlich durch Expression der erfindungsgemäßen Nukleinsäure in einem geeigneten Wirt wie Bakterien, Hefen, Säuger- und Pflanzenzellen.

Die Erfindung betrifft außerdem einen Testkit, der eine Nukleinsäure oder einen Vektor, wie oben beschrieben, oder ein Protein, wie oben beschrieben, enthält. Ferner betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung einer Pflanze, dadurch gekennzeichnet, daß eine Nukleinsäure, wie oben beschrieben, in eine Pflanzenzelle eingebracht wird und eine Pflanze aus der Pflanzenzelle regeneriert wird.

Desweiteren betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zum Erzeugen einer Nematodenresistenz in Pflanzen, das dadurch gekennzeichnet ist, daß eine Nukleinsäure, wie oben beschrieben, in eine nematodensensitive Pflanze eingebracht wird.

Die Erfindung betrifft außerdem einen Promotor, der die Expression der oben beschriebenen Nukleinsäure mit steuert und der dadurch gekennzeichnet ist, daß er wurzelspezifisch aktiv ist.

Der 5'-flankierende Bereich des Gens, ein ca. 1,5 kb XbaI-Fragment, enthält typische Elemente eukaryotischer Promotoren, wie z.B. die TATA-Box. Der Promotor ist offensichtlich wurzelspezifisch, weil nach Northern-Analyse mit Blatt- und Wurzel-RNA lediglich ein Signal mit Wurzel-RNA gefunden wurde. Dies bestätigen auch Experimente mit transgenen Kartoffeln, die mit einem Fusionsprodukt aus dem 1832-Promotor und



dem GUS-Gen transformiert worden sind. Dort zeigten die Wurzeln eine eindeutige Farbreaktion, die auf eine Aktivität des 1832-Promotors schließen ließ.

Damit kann der 1521 Nukleotide umfassende 5'-Bereich des 1832-Gens und Derivate davon mit entsprechender Promotoraktivität für die Expression beliebiger Gene, insbesondere in Wurzelgeweben, unterschiedlicher Pflanzen genutzt werden. Geeignete Derivate sind solche, die mindestens 10 % der Promotoraktivität der 1832.1-Sequenz aufweisen. Anwendungsbeispiele sind die Expressionen von Genen für Resistenz gegen Nematoden sowie Resistenz gegen weitere wurzelbürtige Schaderreger, sowie Expression von Genen, die an der Saccharose-Translokation beteiligt sind und allgemein von Genen, die an der Saccharose- oder Inulinspeicherung beteiligt sind. Derivate des erfindungsgemäßen Promotors sind Sequenzen, die sich von dem Promotor des 1832-Gens z.B. durch Deletionen, Insertionen, Basenaustausche usw. ableiten, wobei die Promotoreigenschaften des 1832-Genpromotors beibehalten werden.

Schließlich betrifft die Erfindung einen Primer für die PCR, erhältlich aus der Sequenz Nr. 1832.1.

Im folgenden wird die Erfindung anhand von Beispielen im einzelnen beschrieben, wobei diese Beispiele den Umfang der Erfindung nicht begrenzen sollen.

### **Beispiel 1**

#### Klonierung des HS1<sup>pro1</sup>-Gens

Für die Klonierung des HS1<sup>pro1</sup>-Gens wurden eng miteinander verbundene Marker identifiziert. Ein B. procumbens-spezifischer Satellit (pRK643) wurde von einer der Fragment-Additionslinien kloniert. Eine Southern-Analyse zeigte, daß alle getesteten, resistenten Linien diesen Satelliten tru-

gen, was andeutete, daß er in der Region des Genoms der Wildart B. procumbens verteilt ist, in der das Gen lokalisiert ist. Dieser Marker erwies sich als hilfreich bei der Identifizierung der Translokationslinie mit dem kleinsten Segment der Wildrübe unter einer Mehrzahl chromosomaler Mutanten. Diese Linie wurde für die positionale Klonierung des Gens ausgewählt. Der Marker pRK643 kosegregierte perfekt mit der Resistenz in einer segregierenden F2-Population von 241 Individuen. Unter Verwendung dieses Satellitenmarkers als Sonde wurden 3 Klone aus einer YAC-Bibliothek der Linie A906001 extrahiert, die die HS1<sup>pro-1</sup>-Genregion umfaßten.

## Beispiel 2

### Identifizierung der transkribierten Sequenzen der YACs

Um die transkribierten Sequenzen der YACs zu identifizieren, wurde eine cDNA-Bibliothek aus den Wurzeln von mit Nematoden infizierten A906001-Pflanzen erstellt und mit den drei YACs gescreent, was zu der Isolierung von drei cDNA-Klonen, nämlich den Nummern 1832, 1845 und 1859 führt. Der Klon 1845 zeigte eine Kreuzhybridisierung mit Zuckerrüben-DNA, während der Klon 1859 multiple Bandenmuster mit der DNA von sowohl anfälligen als auch resistenten Rüben ergab. Die weiterführende Arbeit konzentrierte sich auf die cDNA 1832, da:

1. Diese cDNA ein Einzelkopiesignal mit DNA der resistenten Linien ergab, während kein Signal mit DNA von der anfälligen Zuckerrübe sichtbar war, was die Annahme zuläßt, daß dieses Gen in kultivierten Rüben nicht vorhanden ist. Alle monosomen Additionslinien, die das HS1<sup>pro-1</sup>-Gen trugen, ergaben ein Signal mit dieser Sonde.

2. Es zeigte eine vollständige Cosegregation mit der Resistenzeigenschaft in den segregierenden F2-Populationen.

3. Ein ca. 1,6 kb-Transkript war nur in Wurzeln von resistenten Pflanzen vorhanden, wie durch Northern-Analyse gezeigt wurde. Ein deutlich stärkeres Hybridisierungssignal wurde im Vergleich zu nichtinfizierten Wurzeln mit RNA von Wurzeln gefunden, die mit Heterodera schachtii infiziert waren.

4. Die Sequenzanalyse des vorhergesagten Polypeptids zeigte Motive, die typisch sind für in letzter Zeit klonierte Resistenzgenprodukte.

Unter Zusammenfassung dieser Resultate repräsentierte der Klon 1832 ein willdrübenspezifisches Gen, das nur in Wurzeln exprimiert wird und nach Nematodeninfektion stimuliert wird.

### Beispiel 3

#### Genetische Komplementierungsanalyse

Für die genetische Komplementierungsanalyse wurden Haarwurzelkulturen durch Induktion mit Agrobacterium rhizogenes erhalten und verwendet. Die Haarwurzelkulturen der Zuckerrübe erwiesen sich als geeignetes Substrat für Wurzelpathogene. Die kompatible Reaktion der anfälligen wie auch die inkompatible Reaktion der resistenten Wurzeln auf Zystennematoden wird in Haarwurzelkulturen der Zuckerrübe aufrecht erhalten. Eine anfällige Zuckerrübenlinie (Nr. 93161p) wurde mit der 1450 Basenpaar (bp) cDNA 1832 unter Verwendung eines A. rhizogenes-vermittelten Gentransfers transformiert. Die gentechnische Veränderung der Transformanden wurde durch GUS-Assay und DNA-Blot-Analyse bestätigt. Nach Inokulierung mit J2-Juvenilen wurden sechs unabhängig voneinander transformierte Wurzeln gefunden, die das 1832-Gen exprimierten und dieselbe inkompatible Reaktion wie die resistente Linie A906001 zeigten, während sich Nematoden regelmäßig auf den anfälligen Kontrollen entwickelten und auf den Haarwurzeln, die das Gen nicht enthielten. Anfälligkeit konnte nach

Transformation von einer resistenten Wurzelkultur mit einem Gegensinnkonstrukt der cDNA 1832 wiederhergestellt werden.

Diese experimentellen Daten belegen, daß die Resistenz in Haarwurzeln aus der Linie 93161p von der Expression des 1832 Gens abhängt. Das isolierte Gen wird als HS1<sup>pro-1</sup>-Gen bezeichnet, da es die Nematodenresistenz auf die anfällige Zuckerrübenlinie derartig überträgt, daß sie vollständig mit der Resistenz in der Linie A906001 übereinstimmt.

#### **Beispiel 4**

##### Sequenzierung der cDNA

Die Sequenzierung der gesamten cDNA und des korrespondierenden genomischen Klons zeigte einen offenen Leserahmen ohne Introns von 846 bp, die ein vorhergesagtes Genprodukt von 282 Aminosäuren kodierte, was mit den von den RNA-Blots erhaltenen Daten übereinstimmt.

#### **Beispiel 5**

##### Strukturanalyse der Aminosäuresequenz

Die Aminosäuresequenz des vorhergesagten Polypeptids kann in vier verschiedene Subdomänen unterteilt werden. Ein vermutliches Signalpeptid (Domäne A) kann am N-Terminus definiert werden, der vermutlich die Aufgabe hat, das Protein zur Cytoplasmamembran zu leiten. Eine leucinreiche Region (Domäne C), die in imperfekten, leucinreichen, sich wiederholenden Einheiten angeordnet ist, zeigt sich deutlich am N-Terminus des HS1<sup>pro-1</sup>-Polypeptids. Die sich wiederholenden leucinreichen Einheiten (LRR) sind Teil der Protein-Protein-Interaktion und wurden in vorher klonierten Resistenzgenen aus Pflanzen gefunden, z.B. dem RPS2-Gen von A. thaliana. Ihre Funktion variiert von mutativen Erkennungsstellen in

Rezeptor-ähnlichen Molekülen, die extrazellulär lokalisiert sind, zu katalytischen Domänen von Enzymen, die im Cytoplasma aktiv sind. Ähnlich anderen LRRs, die in Pflanzenresistenzgenen identifiziert wurden, sind die LRRs des HS1<sup>pro-1</sup>-Polypeptids wenig konserviert im Vergleich zu der Konsensussequenz der LRR-Konsensus-Superfamilie. Die LRRs des HS1<sup>pro-1</sup>-Polypeptids sind gekennzeichnet durch ein 20aa-Konsensusmotiv (xLxxaxxaxLxxLxxaxxxL; L = Leucin oder Isoleucin, a = aliphatisches oder aromatisches aa, x = jedes aa). Die Leucin- und aliphatischen Reste an den Positionen 2, 5 und 16 sind in derselben Position lokalisiert wie im Konsensus der LRR-Superfamilie. Das hochkonservierte Asparagin an Position C ist mit einem Leucin/Isoleucin substituiert. Dieses Asparagin fällt ebenso in die Konsensus-LRRs des RPS2-Polypeptids. Die hydrophobe Domäne von 17aa des HS1<sup>pro-1</sup>-Gens (Domäne F) zeigt ein Transmembransegment an. Die C-terminale Domäne enthält aa mit positiv geladenen Resten und eine putative N-Glycosylierungsstelle.

Das Elicitor-Rezeptormodell der pflanzenpathogenen Interaktion deutet an, daß die Produkte der Resistenzgene als spezifische Rezeptoren für pathogene Auslöser gemäß der Gen-für-Gen-Hypothese wirken. Die Sequenzanalyse von HS1<sup>pro-1</sup> deutet an, daß es in einer Gen-für-Gen-Resistenz als Teil einer Kaskade von Abwehrreaktionen involviert ist. Das vorhergesagte Polypeptid besteht aus imperfekten LRRs, die am N-Terminus lokalisiert sind mit einem zusätzlichen Signalpeptid, einer putativen Transmembran-übergreifenden Domäne und einem positiv geladenen C-Terminus, und paßt so in die zweite Gruppe von Pflanzenresistenzgenen.

Ähnliche Proteinstrukturen zwischen HS1<sup>pro-1</sup> und dem Resistenzgen Cf-9 aus der Tomate konnten vorhergesagt werden, obwohl keine signifikante Sequenzhomologie festgestellt wurde. Als mögliche Art der Resistenzreaktion können die ex-

tracytoplasmatischen LRRs als rezeptorerkennende putative Auslöser wirken. Von Nematoden ist es bekannt, daß sie Sekrete produzieren, die mit membrangebundenen Pflanzenrezeptoren interagieren können. Der positiv geladene C-Terminus interagiert möglicherweise mit den cytoplasmatischen Bestandteilen für die Signalübertragung. Alternativ als Protein, das im Cytoplasma lokalisiert ist, kann es als Rezeptor für Auslöser wirken, die in die Zelle über den Mundstachel des Nematoden injiziert wurde.

Durch die Klonierung des ersten Pflanzengenes, das in die Nematodenresistenz involviert ist, sollte es besser möglich sein, den Prozeß der wirtsspezifischen Abwehr gegen Nematoden zu verstehen. Außerdem bietet die Isolierung des HS1<sup>pro-1</sup>-Gens die Möglichkeit, eine Resistenz auf Wirtspezies mit landwirtschaftlicher Bedeutung zu übertragen, in denen keine allele Form des Gens vorhanden ist.

#### **Beispiel 6**

##### Identifizierung und Charakterisierung des HS1<sup>pro-1</sup>-Promotors

Aus einer Lamda-DASHII-Bank wurde mit einem PCR-Fragment aus dem 5'-Bereich des HS1<sup>pro-1</sup>-Gens ein ca. 1,5 kb XbaI-Fragment isoliert, das dem 5'-flankierenden Bereich des Gens und der Sequenz mit der Nummer 1832.1 entspricht. Die isolierte Promotorsequenz enthält die typischen Elemente eukaryotischer Promotoren, wie die TATA-Box mit der Sequenz TACATAAA in der Position -23 vor dem Transkriptionsstart bzw. dem 5'-Ende der cDNA.

Der identifizierte Promotor ist wurzelspezifisch, da in Northern-Blots ein Signal mit der Probe aus dem 5'-Bereich des 1832-Gens nur in Wurzelgewebe gefunden wird.

Weiterhin zeigen Konstrukte enthaltend den erfindungsgemäßen Promotor und ein GUS-Reportergen ausschließlich eine Farbreaktion in Wurzeln transformierter Kartoffeln bzw. Tabak.

Darüber hinaus ist der Promotor durch Nematoden induzierbar. Dies zeigt ein Vergleich der transkriptionellen Aktivität von mit H. schachtii infizierten und nicht infizierten Zuckerrübenwurzeln. Dies läßt darauf schließen, daß der erfindungsgemäße Promotor Transkriptionsfaktoren bindet, die von Nematoden stammen oder die infolge der Infektion gebildet werden.

Die genannten Versuche demonstrieren die Wurzelspezifität des HS1<sup>pro-1</sup>-Promotors.

### **Beispiel 7**

#### Expression der Sequenz 1832 in Arabidopsis

Die cDNA 1832 wurde mit dem GUS-Intron-Gen (Vancanneyt et al. (1990) MGG, S. 245) fusioniert und unter die Kontrolle des 35S-Promotors gebracht. Das Konstrukt wurde unter Zuhilfenahme des Vektors pAM194 (unten beschrieben) nach Standardverfahren mittels Agrobacterium tumefaciens in Arabidopsis thaliana eingebracht. Nach drei Selbstungsgenerationen wurden Linien erhalten, die eine vollständige Resistenz gegen Heterodera schachtii aufweisen, d.h. es wurden keinerlei Zysten oder entwickelte Weibchen beobachtet. Der Resistenztest erfolgte mit infektiösen Larven in einer Petrischale. Ferner wurde die GUS-Aktivität bestimmt.

### **Beispiel 8**

#### Gewebespezifische Regulation des 1832-Promotors

Für die Studien wurde das XbaI-Restriktionsfragment (XbaI-Stellen an Position 1 und 1521 der 1832.1-Sequenz) mit dem

GUS-Intron-Gen fusioniert und mittels dem Vektor pBIN19 und Agrobacterium tumefaciens/Agrobacterium rhizogenes-Kotransformation in die Wurzel von Zuckerrüben und Kartoffeln eingeführt. Bei der Zuckerrübe wurde beobachtet, daß in einer "Hairy-Root-Kultur" die GUS-Aktivität lediglich in dem Synzytium nachweisbar war. In nicht-infizierten Wurzeln oder in Bereichen, in denen sich keine Nematoden befanden, war eine entsprechende GUS-Aktivität nicht sichtbar. Dies zeigt, daß der eingesetzte Promotor ein "Pathogen-Responsive"-Element bzw. Elemente besitzt, das bzw. die nach Nematodenbefall verstärkt aktiviert wird bzw. werden. Somit ermöglicht der 1832-Promotor die gewebespezifische Expression beliebiger Gene in Wirtspflanzen, wie beispielsweise der Zuckerrübe.

#### **Beispiel 9**

##### Expression von cDNA 1832 in Brassica

Es wurden Rapskotyledonen mit einem Konstrukt, enthaltend die Sequenz 1832, wie oben in Beispiel 7 beschrieben, transformiert. Die Anzucht der Kotyledonen erfolgte auf MS-Nährmedium, wobei die Selektion auf MS-Nährmedium unter Zusatz von Carbenicillin erfolgte. Die Untersuchung der Transformanten zeigte positive Ergebnisse sowohl im GUS-Test wie auch in der PCR-Analyse.

#### **Beispiel 10**

##### Identifizierung einer Variante von Klon 1832.1, im folgenden 1832A1 genannt

Es wurde eine Variante zu Klon 1832 identifiziert, die ein offenes Leseraster umfaßt, bei dem das Startkodon mit dem ATG der Position 924 der 1832.1-Sequenz entspricht. Das Stopkodon entspricht der Position 2397 in der Sequenz



1832.1. Die Variante 1832A1 enthält weitere geringfügige Unterschiede im Vergleich zu der Sequenz 1832.1, wie sich aus dem Sequenzvergleich ergibt. Bemerkenswerterweise führen sämtliche Sequenzen, d.h. 1832.1, 1832 und 1832A1 nach Expression in Wirtszellen zur Resistenz gegenüber Nematodenbefall. Ohne an eine Theorie gebunden zu sein, kann man davon ausgehen, daß die kürzere der Sequenzen, nämlich 1832, sämtliche Elemente kodiert, die dem kodierten Protein die Fähigkeit verleihen, eine Resistenz gegen Nematoden hervorzurufen. Figur 3 zeigt schematisch die Kodierungskapazität der 3 Klone 1832.1, 1832 und 1832A1 relativ zueinander. Sämtlichen Klonen ist der Abschnitt 1832 gemeinsam.

### Beispiel 11

#### Herstellen des Expressionsvektors pAM194

Der hergestellte binäre Vektor pAM194 verbindet die Eigenschaften eines Klonierungsvektors und eines Pflanzentransformationsvektors (Ti-Plasmids). Die Eignung als Transformationsvektor wurde zusammen mit Agrobacterium tumefaciens als auch in Kombination mit Agrobacterium rhizogenes für Kointransformationsexperimente geprüft. Der Vektor ist ein Derivat von pBI121 (Jefferson et al. 1987) (Clontech Laboratories); das Grundgerüst für pBI121 stellt pBIN19 (Bevan et al. 1984) bereit.

pAM194 umfaßt folgende Elemente:

- das Fragment außerhalb der Randsequenzen (LB; RB) enthält NPTII, als einen Selektionsmarker;
- die linken und rechten Randsequenzen (LB; RB);
- das NPTII-Gen aus Tn5 für die Selektion in Pflanzen;

- das GUS-Gen aus E. coli mit der ST-LS1-Intronsequenz (Vancanneyt et al. 1990);
- die 35S-Promotor-Terminator-Kassette mit singulären Restriktionsspaltstellen zum Zwecke der Klonierung

#### Herstellung:

Das Plasmid pBI121 wurde mit HindIII/SstI gespalten. Das gespaltene HindIII/SstI-35S-GUS-Fragment wurde ersetzt durch ein subkloniertes 35S-GUS-Intron-Fragment. Die EcoRI-Restriktionsspaltstelle wurde zerstört, indem mit EcoRI gespalten wurde und die überstehenden Enden mit "Klenow-Fragment" von E. coli-Polymerase I aufgefüllt wurden; anschließend wurde erneut ligiert unter Herstellung von pBIN-GUSINT. Eine 35S-Promotor-35S-Terminator-Kassette mit einer einzigen EcoRI-Klonierungsstelle aus dem Plasmid pRT104 (Töpfer et al. 1987) wurde in die HindIII-Stelle von pBIN-GUS-INT kloniert, wobei dies zu pAM194 führte. Die oben angegebenen Literaturstellen lauten wie folgt:

- Bevan M. 1984: Binary Agrobacterium vectors for plant transformation; Nucleic Acids Research Band 12, Nr. 22, 8711.
- Jefferson R.A., Kavanaugh T.A., Bevan M.W. 1987. EMBO Journal Band 6: 3901.
- Töpfer R., Matzeit V., Gronenborn B., Schell J., Steinbiss H.H. 1987; A set of plant expression vectors for transcriptional and translational fusions. Nucleic Acids Research Band 15, Nr. 14: 5890.
- Vancanneyt G., Schmidt R., O'Connor-Sanches A., Willmitzer L., Rocha-Sosa M. 1990. Construction of an intron-containing marker gene. Molecular General Genetics, 245-250.

Die Konstruktion des Plasmids ist schematisch in Figur 4 wiedergegeben.

## Beispiel 12

### Transformation von Zuckerrübe

Zur Transformation wurde Agrobacterium tumefaciens, Stamm EHA101 (Hood E.E. et al. 1986, J. Bacteriology 168, S. 1291-1301), verwendet, der mit dem Plasmid LD10/1832-13 (Figur 5a bis d) oder mit dem Vektor LD10, einem Plasmid, dem die 1832-cDNA fehlte, nach dem Friertauverfahren (Holters et al. 1978) transformiert worden war.

Zur Transformation der Zuckerrübe wurden sterile Zuckerrübensamen des Typs "Elite O-272" zur Keimung gebracht auf einem Medium, enthaltend 2,0 g/l Sucrose und 4,0 g/l Agarose. Die Sämlinge wurden gekappt und die Kotylidonen wurden sorgfältig entnommen und als Explantate verwendet. Der Agrobacterium tumefaciens-Stamm EHA101 mit dem Plasmid LD10/1832-13, oder die Kontrolle mit Plasmid LD10 (Figur 5c) wurde auf LB-Medium (Maniatis et al. 1982), ergänzt mit 50 mg/l Kanamycin, 75 mg/l Spectinomycin, 150 mg/l Streptomycin und 50 mg/l Acetosyringon auf einem Drehschüttler (340 U/min) bei 27°C bis zu einer OD von ungefähr 1,0 (bei 660 nm) kultiviert. Die Bakteriensuspension wurde dann mit LB auf OD 0,1 verdünnt und zur Inokulation mit den Explantaten, die für 2 bis 4 Tage bei 22°C kokultiviert wurden, verwendet.

Die Selektion auf transgene Schößlinge erfolgte nach einer Modifikation des Mannoseselektionssystems. Dabei wurde auf transgene Zuckerrübenschößlinge hin selektiert. Nach der Kokultivierung wurden die Explantate auf Selektionsmedium, bestehend aus MS-Medium (Murashige & Skoog 1962), ergänzt mit 0,05 mg/l  $\alpha$ -Naphthylelessigsäure, 0,25 mg/l 6-Benzyladenin, 500 mg/l Carbenicillin, 20 g/l Sucrose und D-Mannose überführt, wobei die Konzentration der D-Mannose schrittweise während der Selektion erhöht wurde, wobei mit einer Konzentration von 1,25 g/l für die ersten zwei Subkulturperioden

begonnen wurde, dann wurde auf 5,0 g/l für die nächsten 2 Subkulturperioden gesteigert, und schließlich wurde die Konzentration auf 10 g/l Mannose für die letzte Periode erhöht. Jede Subkulturperiode dauerte 3 Wochen. Die Mannose-resistenten Schößlinge wurden weiter auf MS-Medium, dem 0,25 mg/l 6-Benzyladenin zugesetzt waren, kultiviert, und das Ausbilden der Wurzeln erfolgte im wesentlichen gemäß Miedema (1982).

Die Analyse der Mannose-resistenten Schößlinge wurde dann wie folgt durchgeführt. Zum Sicherstellen, daß die Mannose-resistenten Schößlinge, die die Selektion überstanden, transgener Natur waren, wurden sämtliche Schößlinge auf PMI-Aktivität untersucht. Die nicht-transgenen Zuckerrübenschößlinge zeigen keine PMI-Aktivität (Phosphomannoseisomerase). Es wurden Extrakte aus 2-3 Blattspitzen von einer Größe von ca. 3 mm hergestellt und dem gekoppelten PMI-Enzymassay, modifiziert nach Feramisco et al. (1973) und Gill et al. (1986), unterzogen. Ungefähr 80-90 % der Schößlinge zeigten eine signifikante PMI-Aktivität. Die restlichen 10-20 % wurden verworfen.

Zum Durchführen des Nematodentests wurden die Schößlinge mit PMI-Aktivität und guter Wurzelentwicklung (4-6 Wochen alt) von den Agarplatten abgenommen, und die Wurzeln wurden sorgfältig in Leitungswasser gewaschen. In eine 4 x 2 x 12 cm Sandsäule, die auf den Seiten in Plastik eingehüllt war, wurde ein Loch eingeführt und die Schößlinge wurden darin eingepflanzt. Der Sand wurde vorsichtig um die Wurzeln gegeben und sorgfältig gewässert, und die Pflanzen in der Sandsäule wurden unter ein Kunststoffzelt für 10 Tage bei 25°C überführt. Das Zelt wurde nach und nach während dieser Dauer entfernt, um die Pflanzen abzuhärten. Diese Pflanzen wurden mit Nematoden unter Verwendung einer Spritze inokuliert, indem jeweils 200 juvenile Nematoden (J2) möglichst nahe an

der einzelnen Pflanze in den Sand eingebracht wurden. 3 Wochen nach der Inokulation entwickelten sich die weiblichen Zysten, und sie wurden quantitativ bestimmt unter Verwendung eines Stereomikroskops. Die gesamte Wurzel einer jeden Pflanze wurde untersucht. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 1 gezeigt. Diese Tabelle zeigt die Ergebnisse, die erhalten wurden mit der nicht-transgenen, anfälligen Linie C<sub>1</sub>, der transgenen Kontrolllinie CLD10, der nicht-transgenen anfälligen Kontrolle, die aus Samen entwickelt wurden (C<sub>2</sub>), und den transgenen Pflanzen, die das Konstrukt LD10/1832-13 enthalten (T<sub>1</sub>-T<sub>9</sub>).

Pflanze	Anzahl der Pflanzen	durchschnittliche Anzahl an Zysten/Pflanze	ID-Nummer
Kontrolle C <sub>1</sub>	4	9	lab 535
Kontrolle C <sub>2</sub>	9	9,3	Samenpflanzen
Kontr. CLD10	2	9,5	T9600130
T <sub>1</sub>	2	14	1458D
T <sub>2</sub>	2	9,5	1468A
T <sub>3</sub>	2	4	143614J
T <sub>4</sub>	4	4,3	14479K
T <sub>5</sub>	2	2,5	144710L
T <sub>6</sub>	3	5,3	14054D
T <sub>7</sub>	4	6,75	142611H
T <sub>8</sub>	5	5	14052B
T <sub>9</sub>	4	7,5	14053C

9 unabhängige transgene Linien mit dem Konstrukt LD10/1832-13 wurden in diesem Test analysiert. 2 (T<sub>1</sub> und T<sub>2</sub>) haben ungefähr die gleiche Anzahl an Zysten entwickelt wie die Kontrollen C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub> und CLD10. 3 der transgenen Pflanzen (T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub> und T<sub>8</sub>) zeigen eine Zystenentwicklung von ungefähr der Hälfte der Kontrollen, wobei dies anzeigt, daß das Gen in diesen Pflanzen bis zu einem gewissen Grade aktiv ist. Eine der transgenen Linien, T<sub>5</sub>, zeigt eine Zystenentwicklung, die den

zuvor berichteten Ergebnissen (Cai et al. 1997) entspricht. Die T<sub>5</sub>-Linie entwickelte nur durchschnittlich 2,5 Zysten pro Pflanze, wobei dies deutlich niedriger ist als die Anzahl an Zysten, die im Mittel von ungefähr 10 Pflanzen für die verschiedenen Kontrollen beobachtet wird. Dies zeigt deutlich, daß das 1832-Gen in den Wurzeln einer Zuckerrübenlinie, die kommerziell von Interesse ist, aktiv ist.

Die oben erwähnten Literaturstellen lauten wie folgt:

- Cai D., Kleine M., Kifle S., Harloff H.-J., Sandal N.N., Marcker K.A., Klein-Lankhorst R.M., Salentijn E.M.J., Lange W., Stiekema W.J., Wyss U, Grundler M.W. und Jung C. (1997) Science 275, 832-834.
- Feramisco R., Tilley B.E., Conn W.R., Gracy R.W., Noltmann E.A. (1973) Biochem. Biophys. Res. Comm. 55: 636-641
- Gill J.F., Deretic V., Chakrabarty A.M. (1986) J. Bacteriol. 167: 611-615
- Holters et al. (1978) Mol. Gen. Genet. 163: 181-187
- Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. (1982) Molecular Cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, USA
- Miedema P. (1982) Euphytica 31: 635-643
- Murashige T., Skoog F. (1962) Plant Physiol. 15: 473-497

### Beispiel 13

#### Herstellen des Plasmids LD10/1832-13

In Figur 5a-d ist die Herstellung des genannten Plasmids dargestellt. Das XbaI-Fragment von Nukleotidposition 1521-2904 aus der SEQ ID Nr. 1 wurde mit Klenow-Enzym zu glatten Enden aufgefüllt. Dieses Fragment wurde dann in die mit glatten Enden versehene BamHI-Stelle des Plasmids pPS48 eingefügt. Dieses neue Plasmid, pPS48/BamHI-15 genannt, wurde dann mit HindIII gespalten. Das HindIII-Fragment von Basen-

paar 0-2403 wurde in die HindIII-Stelle des Plasmids pLD10 eingeführt, wobei Plasmid LD10/1832-13 erhalten wurde.

#### **Beispiel 14**

##### Transformation von Brassica napus mit der Sequenz 1832 zur Erzeugung von Nematodenresistenz und Resistenztest

Als Transformationsvektor wurde das Ti-Plasmid pAM194, enthaltend das Gen für die Nematodenresistenz (Sequenz 1832) verwendet. Der Vektor ist im einzelnen näher in Beispiel 11 beschrieben.

Als Bakterienstamm wurde Stamm C58C1 ATHV Rif verwendet, der sich vom Agrobacterium tumefaciens-Stamm EHA101 ableitet, welcher das Helferplasmid pEHA101 ohne Kanamycinresistenz trägt.

Der Stamm AMT entspricht dem oben genannten Stamm C58C1 ATHV Rif, der das Plasmid pAM194-1832 enthält.

Die Anzucht der Bakterien für die Transformation erfolgte für die AMT-Kultur auf LB-Agar mit 50 mg/l Kanamycin und 100 mg/l Rifampicin und wurde bis zum Gebrauch im Kühlschrank aufbewahrt. Zwei Tage vor der beabsichtigten Transformation werden 30 ml LB-Nährmedium mit der entsprechenden Bakterienkultur angeimpft. Zur Bakterienselektion enthält das Flüssigmedium, wie auch der LB-Agar, 50 mg/l Kanamycin und 100 mg/l Rifampicin. Die Bakterien wurden 24 im Dunkeln bei 28°C auf einem Schüttler bei 190 upm inkubiert. Am zweiten Tag impft man 30 ml LB-Medium ohne Antibiotika mit 20 µl der oben genannten, nach 24 Stunden erhaltenen Bakterienkultur an und inkubiert für weitere 24 Stunden bei gleichen Bedingungen.

Zur Anzucht von Sommerraps in vitro (Brassica napus ssp. oleifera cv. Sommerraps) wird das Saatgut in sterilen Erlen-

meyer-Kolben mit NaOCl (3 % aktives Chlor) für 10 Minuten sterilisiert und anschließend 3 x mit sterilem destilliertem Wasser gespült. Die Samen werden dann auf MS-N-Medium mit B5-Mikroelementen und Vitaminen ausgelegt. In einem Container mit 50 ml Nährmedium werden 10 Körner ausgelegt. Die Körner werden bei ca. 2000 Lux und einem Tag-/Nacht-Rhythmus von 16 h/8 h für 4 Tage inkubiert. Die Anzuchttemperatur beträgt 25°C.

Zur Transformation mit A. tumefaciens (Kotyledonentransformation) werden von vier Tage alten Keimlingen die Kotyledonen mit einem Skalpell kurz über dem Meristem abgetrennt. Dazu faßt man beide Kotyledonen mit einer Pinzette und trennt sie gleichzeitig mit einem geraden Schnitt ab. Sofort nach dem Abtrennen taucht man die Petiole der Kotyledone für 10 sec in die unverdünnte Bakteriensuspension (Übernachtskultur). Dann werden die Kotyledonen zurück auf das Anzuchtmedium gesteckt. Die Cokultur von 48h wird bei 25°C und Dämmerlicht durchgeführt. Nach Beendigung der Cokultur werden die Kotyledonen in Container mit 50 ml MSM-Medium, das 750 mg/l Carbenicillin zur Bakterienabtötung enthält, gesetzt und 7 Tage bei 25°C und 2000 Lux bei 16 h Tag kultiviert. Nach 7 Tagen auf MSM mit 750 mg/l Carbenicillin werden die Kotyledonen auf das gleiche Nährmedium umgesetzt, das zu Beginn zusätzlich 20 mg/l Kanamycin zur Sproßselektion enthält. Bei späteren Passagen ist die Kanamycin-Konzentration auf 25 mg/l erhöht worden. Nicht-transgener Kallus wird turnusmäßig entfernt. Die abgetrennten Sprosse werden zur weiteren Selektion bzw. zum Nachweis der Transgenität auf B5-Medium mit 50 mg/l Kanamycin und 400 mg/l Betabactyl gesetzt. Das mitübertragene GUS-Gen erlaubt eine weitere Identifikation transgener Sprosse zum frühestmöglichen Zeitpunkt. Die Bewurzelung der transgenen Sprosse findet auf B5-Nährmedium ohne Hormone statt.



Zum molekularbiologischen Nachweis der Genübertragung wird ein GUS-Test als histochemischer Nachweis auf  $\beta$ -Glucuronidase-Aktivität durchgeführt. Das Enzym spaltet Indol von einem künstlichen Substrat ab, so daß sich GUS-positive Blattstücke blau färben. Der Testablauf ist gemäß Jefferson R.A. (1987): Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system. Plant Mol. Biol. Rep. 5: 387-405.

Ein weiterer molekularbiologischer Nachweis der Genübertragung ist der NPTII-ELISA-Test, bei dem die Bildung des Enzyms Neomycin-Phosphotransferase, welches der transgenen Pflanze Kanamycin-Resistenz vermittelt, qualitativ und quantitativ nachgewiesen wird. Der Test wurde mit dem NPTII-ELISA-kit (Kat. Nr. 5307-610101) der Firma CP Instruments Co., Ltd. durchgeführt.

Um ständig ausreichende Larvenmengen für die Inokulation bei Resistenztests mit Heterodera schachtii zur Verfügung zu haben, wurden die Nematoden an den Wirtspflanzen Senf (Sorte "Albatross" Petersen-Saat-zucht) sowie Rüben vermehrt. Die Samen werden in 3 %iger  $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ -Lösung für 10 min und anschließend 3-4 x mit sterilem destilliertem Wasser gespült. Anschließend trocknen die Samen auf sterilem Filterpapier und werden dann auf Wasseragar mit 8 % Agar-Agar aufgelegt. Nach 3-4 Tagen auf diesem Agar bei 25°C in Dunkelheit werden die jungen Keimlinge auf 0,2 konzentriertes Knoop-Medium umgesetzt. Die Wurzeln sollten dabei etwa 3-4 cm Länge aufweisen. Verwendet werden Petrischalen mit 15 cm Durchmesser und Nocken, in die zwei Keimlinge gegenüber plaziert werden. Nach 14 Tagen Wachstum im Dunkeln bei 25°C erfolgt die Inokulation mit 1000 Nematodenlarven im L2-Stadium. Nach etwa 4 Wochen bei 25°C in Dunkelheit haben sich reife Zysten gebildet, die nun gesammelt werden können.

Bei der Zystenernte werden mit einer Federstahlpinzette ca. 200 Zysten in ein kleines Sieb, Maschenweite 50-200  $\mu\text{m}$ , gesammelt, welches in einem Glastrichter gefüllt mit Zinkchloridlösung (3 mM) steht. Am Trichterauslauf ist ein Silikon-schlauch befestigt, welcher mit einer Stahlschlauchklemme abgeklemmt ist. Diese Anordnung steht in einem hohen 250 ml Becherglas, welches mit einer Alufolie abgedeckt wird.

Nach 3 Tagen bei 25°C im Wärmeschränk haben sich die geschlüpften Larven vor der Stahlklemme im Silikon-schlauch gesammelt und können durch kurzes Öffnen der Klemme in ein Sieb mit 15  $\mu\text{m}$  Maschenweite geerntet werden, wobei der Trichter mit einer Pinzette gehalten wird. Die Larven werden nun 3 x mit sterilem Wasser gespült und anschließend mit einer Pasteurpipette in ein steriles Blockschälchen überführt. Nach etwa 3 min Wartezeit, in der die Larven zu Boden sinken, wird die überschüssige Flüssigkeit weitestgehend abgesaugt und durch 0,5 %ige Gelrite-Lösung ersetzt, die eine homogene Verteilung der Larven gewährleistet. Nach sorgfältigem Durchmischen wird die Konzentration der Larven mittels Stereomikroskop überprüft, wobei die Larven in einem 10  $\mu\text{l}$  Tropfen gezählt werden.

Zur Durchführung der in vitro-Tests wurden die Wurzeln von den Sprossen der transgenen Ausgangsklone abgetrennt und auf  $\frac{1}{2}$  B5-Medium mit 300 mg/l Betabactyl und 8 g/l Daishin-Agar aufgelegt. Jede Inokulation eines transgenen Ausgangsklons wird mit je 5 Wurzeln durchgeführt. Als anfällige Kontrolle wird Ölrettich verwendet, dessen Wurzeln wie oben beschrieben erhalten worden sind. Pro Schale werden etwa 100 L2-Larven von Heterodera schachtii auf die Wurzeln getropft, die wie oben beschrieben erhalten worden sind. Zur Inokulation wird eine Multipette mit 0,5 ml Combitip verwendet. Die mit Parafilm versiegelten Schalen inkubieren bei 25°C im Dunkeln. Die erste Zählung der gebildeten Zysten erfolgt

nach 14 Tagen, die zweite und letzte Zählung nach 20 Tagen, wenn die Zysten bereits schwach gebräunt sind und sich so besser von den weißen Wurzeln abheben.

Bei der Durchführung der in situ-Tests werden zunächst je 5 Sprosse pro transgenem Ausgangsklon in das Gewächshaus überführt. Die Sprosse sollten sich dazu bereits etwas gestreckt haben und einige wenige Wurzeln besitzen. Sie werden in Aussaaterde pikiert, in der sie 1,5 Wochen verbleiben, um mehr Wurzelmasse zu entwickeln. Überdies gibt ihnen das die Möglichkeit, sich an die Gewächshausbedingungen zu aklimatisieren. Nach 1,5 Wochen werden die Pflanzen in Quarzsand mit einem Kordurchmesser von 0,1-0,5 cm pikiert, der zuvor mit Nährlösung nach Steiner angefeuchtet worden ist. Die Inokulation wird in diesem Sand durchgeführt, da das Ausschlämmen und Auszählen der Zysten durch Humusteilchen und Schmutzpartikel stark erschwert wird. Der Sand befindet sich in Röhrchen, die in einer Kiste aufgestellt werden. Da die Randbereiche einer Kiste den Pflanzen mehr Licht und damit bessere Wachstumsbedingungen geben, werden die Testpflanzen von anderen Pflanzen umgeben, so daß jede Testpflanze einen Nachbarn hat. Eine Woche nach dem zweiten Pikiertermin erfolgt die Inokulation mit (600) frisch geschlüpften H. schachtii-Larven, L2-Stadium. Die Auswertung erfolgt nach ca. 6 Wochen, wenn die Zysten braun geworden sind und leicht von den Wurzeln abgespült werden können. Die Zysten werden durch Abspülen mit einem scharfen Wasserstrahl durch ein Küchensieb von den Pflanzenwurzeln abgetrennt, in einem 100 µm Sieb aufgefangen und durch Zentrifugation vom Sand getrennt. Das erhaltene Gemisch aus Zysten, feinen Wurzeln und Wasser wird filtriert und die Zysten dann unter dem Biokular bei 10-facher Vergrößerung ausgezählt.

Die Transgenität der Pflanzen wurde durch PCR-Analysen sowie NPTII-ELISA- und GUS-Tests gezeigt.

Die Tabelle zeigt die Ergebnisse aus dem in vivo-Resistenztest mit der nicht-transgenen anfälligen Sorte T<sub>0</sub> und den transgenen Pflanzen T<sub>7</sub> bis T<sub>15</sub> mit dem Gen 1832.

Ident.-Nr.	Anzahl Wurzeln	Ø Zysten/Wurzel
T <sub>7</sub>	10	14,4
T <sub>8</sub>	9	19,0
T <sub>81</sub>	2	14,5
T <sub>9</sub>	7	21,3
T <sub>10</sub>	6	18,8
T <sub>11</sub>	6	10,2
T <sub>12</sub>	5	23,6
T <sub>13</sub>	5	18,4
T <sub>14</sub>	9	19,2
T <sub>15</sub>	3	14,7
T <sub>0</sub>	9	19,1

10 unabhängige, transgene Linien mit dem Gen 1832 wurden in diesem Test ausgewertet. 6 Linien (T<sub>8</sub>, T<sub>9</sub>, T<sub>10</sub>, T<sub>11</sub>, T<sub>13</sub> und T<sub>14</sub>) hatten eine vergleichbare Anzahl von Zysten wie die anfällige Linie; 3 Linien (T<sub>7</sub>, T<sub>81</sub> und T<sub>15</sub>) hatten im Vergleich zur Kontrolle eine Reduktion der Zysten von 27% und 1 Linie (T<sub>11</sub>) eine Reduktion der Zysten von 47 %. Dies zeigt, daß das Gen in den Pflanzen aktiv ist und bei Brassica napus eine deutliche Reduktion des Zystenbefalls zu erzielen ist.

#### Beispiel 15

Kartoffeln der Sorte Bintje wurden mit dem Plasmid pAM194 mit dem Insert 1832 unter der Kontrolle des 35S-Promotors mit A. rhizogenes transformiert. 40 unabhängige Hairy-Root-Kulturen wurden mit je 250 Globodera pallida-Larven inokuliert. Nach 56 Tagen wurde die Nematodenentwicklung untersucht. 35 Kulturen zeigten eine normale Nematodenentwicklung mit durchschnittlich 40 reifen Weibchen/Petrischale. An 5 Wurzelkulturen war die Entwicklung von Weibchen gestört. Dort wurden nur je 10 reife Weibchen gefunden. Dies zeigt, daß die Sequenz 1832 in Kartoffeln deren Resistenz gegen Nematodenbefall verbessern kann.

## SEQUENZPROTOKOLL

## (1) ALLGEMEINE ANGABEN:

## (i) ANMELDER:

- (A) NAME: Prof. Dr. Christian Jung
- (B) STRASSE: Zum Amt 15
- (C) ORT: Daenischenhagen
- (E) LAND: DEUTSCHLAND
- (F) POSTLEITZAHL: 24229

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Nematodenresistenzgen

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 5

## (iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 5401 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

## (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Beta vulgaris
- (B) STAMM: A906001

## (vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

- (A) BIBLIOTHEK: lambda DASHII
- (B) CLON(E): 1832.1

## (viii) POSITION IM GENOM:

- (C) EINHEITEN: 5401

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

TCTAGAGCTG TCGACGCGGC CGCGGAATTA ACCCTCACTA AAGGGAACGA ATTCGGATCT	60
TCTTTCTTGG TGCTTAATTT TTTGACACTA ATCCGATTCT TAGCATTAAAG TTGAAGCACA	120
CTCTTGATAA ACTATGTTAC TATGTATCAT TGTCAATATG CTAAGAATTT GTCTTGACCT	180
CATCGCTATG TATAAGCATC TAATACTTTC CTAACTAGT AAAAACAAAT ATTCCATCCG	240
TCCCATAATA TGAGTCCCCT TTCTATTTTA GGAGTCAAAA TTTTAAAATT TTTGACCAAA	300
TATTCTTATT ACTATATATA AAAACATATT CATGTGGGAT CTTGTTAGAT TCGTCTTAAT	360

ATGTATTTTC	ATAATATCAA	CTTTTATAT	TTTTTTACTA	ATACGAAATT	GAAGATATAC	420
AATGTCTTAA	AGACTATGCA	AAAGTAAGCA	GAACCTATAT	TTTGGGACGG	AGGGAGTAAT	480
AAGTAATATT	GATTGACGCA	TAATTTGTAT	ATAAATATTT	CAAATTGATA	CTACTTTAAA	540
TAATATAGTT	AATGCTTATA	AATAAGCCTA	AAGACTGTGA	ATAGCAAGAT	CGTTAAAAAT	600
AAAATTTGAA	AATATTTGAT	ATGGATAATG	AAATTGGAAA	TGGCATGCTT	AGCTTCTCGG	660
GAATCTTATA	CCGCTACATC	TATAATAAAA	ATTCCTCATA	AAATTTTGCC	CATTTTAAAC	720
CACGAAATTC	GTCTTTTAC	GCGAGCCCTT	TCCACACGTC	TTTAAAATTT	AAAAACCTCG	780
TCTTTACTCT	CCCCACCTAT	ATATATACAC	GTCCCCCTT	CTCTACTTCC	CATCTCACAT	840
ACACATACCC	AATCCACAAA	CTTCCATCTT	ATCCAACCTT	CTCTCACCTA	TCTCCTTCTT	900
CAATTTTCAA	AACTCAAAAG	AAAATGGTAG	ATTTTCGATTG	CAAAACAAAA	ATGGTACAAT	960
CAACACCAAA	CCTCACAAAA	AAATCTCCAA	AAATCACAAAC	CAAACGCACA	ATATCAACAC	1020
CATTAATTTT	ACCAGTACCA	GTAATTTCCG	GCGAATTATC	TCCGGCGTCG	GAATCATCCT	1080
GTTTCAGCTT	CGAATCGTAT	CTCAAATTAC	CGGAGCTCCG	TCAACTATGG	AGTTCAAAAG	1140
AATTCCCCGG	TTGGGATAAC	GAACCGATAA	TCAAACCGGC	TTTGCAAGCA	TTAGAGATAA	1200
CATTCCGGTT	CATCTCACTC	GTTTTATCCG	ACGCTAGACC	GTACATAAAC	CGGCGAGAAT	1260
GGAACCGGAA	ATTAGAGTCG	TTAGCGAGAG	ATCAAGTCCG	AAACTCATCT	CAGTTCTCTG	1320
CGGAAGACGA	TGAGACACGT	GGATCAGCTC	CGAATCGTTG	ATCTGACGTC	ATCGTATGGT	1380
GAGGTGATGT	CACAAACAGA	AGTTCAGCGG	AGGTATGGAA	GCTTGCGAAT	GGAGAACATG	1440
ATACTACCGT	GGTCTGTCGT	AGTAGCGAAT	TTAGTCTCCT	TCCGAGGTTA	GCCACGTGGC	1500
AGAAGTCGGA	GGAGATTGCT	TCTAGAATCT	TCTACGCGGT	TGAATCTGCT	ATGAGAAGGT	1560
GTGGGTATAG	TTTGGGCCTT	GGTGAGCCCA	ATTTGGACGG	AAAGCCCAAT	TTAGATTACG	1620
ACGCCGTTTG	TCGTCCTTCT	GAGCTTCACG	CGCTTAAAAA	GGGCGCGTTG	GATTATATTC	1680
AGAATTCGGA	AAATCAGATA	TTGTTTACAA	TTCATCAGAT	TTTCGAGTCG	TGGATTTTTT	1740
CCTCGAAAAA	ATTGTTGGAT	CGAATAAGTG	AGAGGATCAG	TAAAGAAGAG	TTTACCAAAG	1800
CAGCAGATGA	TTGTTGGATA	CTGGAGAAAA	TATGGAAGTT	ATTGGAGGAA	ATCGAGAATT	1860
TACATTTATT	AATGGATCCT	GACGATTTCC	TGCATCTGAA	GACGCAACTG	AGGATGAAAA	1920
CAGTGCGGGA	TTCTGAAACT	TTTTGTTTTC	GATCAAAAGG	ACTGATCGAG	GTAACAAAAT	1980
TAAGCAAGGA	TCTACGGCAC	AAGGTGCCGA	AGATCCTTGG	TGTAGAGGTG	GACCCTATGG	2040
GAGGACCGGT	GATACAAGAG	TCGGCAATGG	AGTTGTACCG	AGAAAAAGA	AGATACGAGA	2100
AGATACATCT	GTTACAAGCG	TTTCAAGGGG	TGGAATCCGC	TGTTAAAGGG	TTTTTCTTTA	2160

ATTATAAACA	GTTGTTGGTG	ATCATGATGG	GTAGTTTGGG	AGCGAAAGCG	AATTTTGCTG	2220
TGATTGGTGG	TTCTACTGAG	TCTTCGGATT	TGTTGGCTCA	GTTGTTTTTA	GAACCTACTT	2280
ATTATCCGAG	TTTGGATGGT	GCCAAGACTT	TTATTGGTGA	TTGTTGGGAG	CATGATCAGG	2340
CTGTTGGTAG	CGGCCTCGAT	TGTCGTCATC	ATCGGAAGAA	TCGGACTGCG	AAACAATGAT	2400
GGTTTCGAAG	TTAGTTTTTG	ATTGAGTTTG	GTTTGATCTG	ACTCGGCTGA	GTAATGGGCG	2460
GCGATAGGGA	GGTTATGGAG	AACGTGGGGC	GGAAAGTGGG	TGGCCTTGTT	AGTGAGACGT	2520
GCAAACTTTG	GTTACTATTA	CATGTGATAT	ACTTATATTT	AGTGGGAATA	TTGCTTTGGT	2580
GTATATAGAT	AAATTTTTGA	ATTAATTGTT	ACACTTGTAT	TAGTAAATTC	TGTATCATGA	2640
TGATTATAAC	ATGAATTTTT	TGTTGTGACT	TTAAATGAGA	TTTATGCTCC	TTAATCCTTA	2700
TTTCACTGAT	ATTATTTTTT	TGTAGTCTGA	GTATAAGTGC	GGAGTTTAAT	CAAGCAAGAG	2760
AAAATAATAG	AAGGTGATTG	CATACTTGGA	TTGGAGATCA	ATATCTAAAA	GATGGTTATG	2820
AAACTATTGT	GAATAACGGA	GTACATGTCC	AACACCACAC	ACGTATGACT	GTGTACCTCT	2880
AATTTACAAA	GAGATTTACA	AAATCTAGAT	GAGTTTTGAT	ATGATCGACA	TTGTCTCTAA	2940
ATGGGAGATA	AGAATTAAAT	CGTGAGGCTC	TTTGCGGCTA	GNTCTTCCGA	ATAAAAATAAG	3000
AAACAATGGT	TTACTCTAAT	TCANTTTTCC	AATTGGCAAA	GTGGCACAAG	CTTCAATAAN	3060
TNGGCTCTTC	ACAATTGAGT	ATAAAAGAAT	GGGTAAATTA	CNCCGGNCTT	TGAATAAAAT	3120
TAATCCTATT	TAATTGTTTT	TGAAATATTC	TTAAAAATAN	CGTTGTCTAA	TACTTTCTTT	3180
AGTTGGGACC	CGGTTCTGAA	CCNACTTAAA	TTAATGGGCT	CAATGGCCGC	CTAATTTCTT	3240
CTTGTTATTT	TTAGCCTTTT	TTTCCTTTT	TTCCCTTTA	AAATAACTAT	TTGTTCTCTT	3300
GAATATCTTA	AAATACGTGT	CTATCANNCT	TAGTTGGACC	GTCTGAACTA	TTATTATGCT	3360
ATGCACTATT	CCTTTGTATT	TACCTTTTTT	TTTTTCCTTT	AAATACTATT	GTTCTCATT	3420
CAATTATATT	CTATTTTTGT	TAAAAAACGG	TCCTAATTTT	TACAACAGTA	AAATTATTGA	3480
TTTTCTTCT	ATATTAAAAT	TTGAAAGTGA	ATGTATTTTC	AAATTTAGGT	ATATGAATAT	3540
TTATATTGTT	CGATTAATGA	TGATAAAAGG	ATTTTACTCA	TTAACCTAAA	CCATTTCTAG	3600
ATAAGATAAG	AGGAACTTCC	ACCTAGTTAA	CATGTCTCAC	TTTCCTAGTA	GACGAATCTA	3660
AATTGCGTTG	CTGGATTTAG	AACTTTGGTC	AAGATAATGG	CAAAACTTTC	AAGCACCCGT	3720
AGATGCATTT	TCCNCGACAT	TTCTCATACA	GCACTAAACG	TTTCAACTTC	CTCTTTTATT	3780
TTCTTGAAAT	TTTTTGTGGC	AATGAGAAAC	GTTCGAAGTT	GATCTTTGCG	TTTCGACGAT	3840
TTGAAATAAG	AAAATGCGTA	TTGTCGGCAA	CTGATTGTAG	TAGTTGCNGT	TATTATAATG	3900
ATAGTCTTTT	ATATAGAATT	CATTTAATTC	TAATTCATTT	GAATCCAGTT	AAGTTGAGTT	3960

TAGTTTAGTC AGCCTAAAAG AACAAAGTAA GTCATGGAAT GGAATGAAGA TGTAATCAAA	4020
TAGAGGAGGG GCTGATAACA ATAATTATTA CTTATGTTGC GTGTTCAATT CAGTAATGAA	4080
AAAAATAAGG TTGAATTAGG AGGGTAATAC AATTATTACC GGTGATGTGA TAAACTAAT	4140
GTTTAAGGGT TTAAGTTACT CTAAACCCTC AATTAAACAT AGTCTAACAA AAAATTCTCA	4200
TAATCTAAAT CAAACACGTA CTTATACAAT CCTCTACATG AATCCGTTTC TAACTCTAAA	4260
GGAAGATCGA TACTTATTAG AATCCGTTTC CAACCCTAAA AATGACTGAT CAAAGGTTCA	4320
TGGATTTTGG AAGGGAAAGA CGAATGCGAG GGCAGTGTAC AGGATAATGT GCATGAGATG	4380
GCAAGGGTCA TGCTAGTTAG AGCAAAATAT ANATGACTTA ATTCAAAAAC TACCTACTAT	4440
TTCAAATTAA TAGACTTTAT TGGAGTCATG AAGTGTACTG TTTGGTACAC CCCACATTAC	4500
TCATGCACTA CACCTAATTT GTCACAGCAT TCAGCTGCCC TTGTTTTGCA GTCTTTGGAG	4560
CTGGCGTGCC TCTTGTTGCT GGTTAGTCGG CGCTTGGTCT GTTGTGNNGT GACCCTCTGT	4620
TTTTTTTTTT TTTTAAATG GTCGCTGATT ACTAINTCTGT GTATTNCATT TTGTACTCCC	4680
TCGTATCCAA TTATATGCTA CACTTTTTTT GCGGACTCCA AAACGTTTTT TTTTNTGTC	4740
CGAGAGATAG AGAGGAAAAG CCCATGTTGT TAGGAGAGAG NTCGGGAGAA GGAAAAGCCA	4800
AATAAAGAAG TAATAACATC TAAATAAGAA AATTCCTTTG ATGGAAAGTG TAGCGACTAA	4860
AAAACGAAGG ACAATATGTA GTTTTCATAT GCCTTTACCT TTGCAATCTC CTTTTTTATT	4920
GTTTACCCAT ACTGGATTAG GTTGGATTTA TCAACACAAA ATGAGTTGGA CTATATCACT	4980
ACATTACTGT GGTCTGTGG ATACATCAAC AAAAAAATG AGTTGGACCA TATCAATGTG	5040
TTAGCGTGGA TTATGTACAC ATTGGACTGG AGTTGAAGCA AATATAATCT GAAAAGGGCG	5100
ATGGGTTAGG TCATGAGGTA TTTAGAATAA GACTTTGATC AAGCCCAAAT CCACCCGCAA	5160
AGAATTATAC CCTTTATTTT CAAGGCACCA TCACTGCATA AAATAATCTG AAATGCCACA	5220
AAAGATTAAC GTCCAATATG CTCACAGCCA AAAATCAATC CATTATTGTT TGGTAAGAAA	5280
AGGTAATAGG CTAGATCAAT TTGCTGCCAA TTGCCAGGCC TGTGGGCCTG TCACCTGTGG	5340
GTAATTTAAT ATGNCTCAAA TGGGTCGGCC TGTTAAGTAC ACCAACATGA ACTTAAAGCT	5400
T	5401

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 849 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA



(viii) POSITION IM GENOM:  
(C) EINHEITEN: 849bp

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

ATGAGAAGGT GTGGGTATAG TTTGGGCCTT GGTGAGCCCA ATTTGGACGG AAAGCCCAAT	60
TTAGATTACG ACGCCGTTTG TCGTCCTTCT GAGCTTCACG CGCTTAAAAA GGGCGCGTTG	120
GATTATATTC AGAATTCGGA AAATCAGATA TTGTTTACAA TTCATCAGAT TTTCGAGTCG	180
TGGATTTTTT CCTCGAAAAA ATTGTTGGAT CGAATAAGTG AGAGGATCAG TAAAGAAGAG	240
TTTACCAAAG CAGCAGATGA TTGTTGGATA CTGGAGAAAA TATGGAAGTT ATTGGAGGAA	300
ATCGAGAATT TACATTTATT AATGGATCCT GACGATTTCC TGCATCTGAA GACGCAACTG	360
AGGATGAAAA CAGTGGCGGA TTCTGAAACT TTTTGTTCCT GATCAAAGG ACTGATCGAG	420
GTAACAAAAT TAAGCAAGGA TCTACGGCAC AAGGTGCCGA AGATCCTTGG TGTAGAGGTG	480
GACCCTATGG GAGGACCGGT GATACAAGAG TCGGCAATGG AGTTGTACCG AGAAAAAGA	540
AGATACGAGA AGATACATCT GTTACAAGCG TTTCAAGGGG TGGAATCCGC TGTAAAGGG	600
TTTTTCTTTA ATTATAACA GTTGTGGTG ATCATGATGG GTAGTTTGA AGCGAAAGCG	660
AATTTTGCTG TGATTGGTGG TTCTACTGAG TCTTCGGATT TGTTGGCTCA GTTGTTTT	720
GAACCTACTT ATTATCCGAG TTTGGATGGT GCCAAGACTT TTATTGGTGA TTGTTGGGAG	780
CATGATCAGG CTGTTGGTAG CGGCCTCGAT TGTCGTCATC ATCGGAAGAA TCGGACTGCG	840
AAACAATGA	849

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) LÄNGE: 1774 Basenpaare  
(B) ART: Nucleotid  
(C) STRANGFORM: Einzelstrang  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:  
(A) ORGANISMUS: Beta vulgaris  
(B) STAMM: B883

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:  
(A) BIBLIOTHEK: lambdaZAPII  
(B) CLON(E): ext1832-16c

(viii) POSITION IM GENOM:  
(C) EINHEITEN: 1774

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

CCACAAACTT CCATCTTATC CAACTTTCTC TCACCTATCT CCTTCTTCAA TTTTCAAAAC	60
TCAAAAGAAA ATGGTAGATT TCGATTGCAA AACAAAAATG GTACAATCAA CACCAAACCT	120
CACAAAAAAA TCTCCAAAAA TCACAACCAA ACGCACATA TCAACACCAT TAATTTACCC	180
AGTACCAGTA ATTTCCGGCG AATTATCTCC GCGCTCTGAA TCATCCTGTT CAGCTTACGA	240
ATCGTATCTC AAATTACCGG AGCTCCGTCA ACTATGGAGT TCAAAAGAAT TCCCCGGTTG	300
GGATAACGAA CCGATAATCA AACCGGCTTT GCAAGCATTG GAGATAACAT TCCGGTTCAT	360
CTCACTCGTT TTATCCGACG CTAGACCGTA CATAAACCGG CGAGAATGGA ACCGGAAATT	420
AGAGTCGTTA GCGAGAGATC AAGTCGAACT CATCTCAGTT CTCTGCGAAG ACGATGAGAC	480
ACGTGGATCA GCTCCGATCG TTGATCTGAC GTCATCGTAT GGTGAGGTGA TGTACAAAAC	540
AGGAAGTTCA GCGGAGGTAT GGAAGCTTGC GAATGGAGAA CATGATACTA CCGTGGTCTG	600
TCGTAGTAGC GAATTTAGTC TCCTTCCGAG GTTAGCCACG TGGCAGAAGT CGGAGGAGAT	660
TGCTTCTAGA ATCTTCTACG CGGTTGAATC TGCTATGAGA AGGTGTGGGT ATAGTTTGGG	720
CCTTGGTGAG CCCAATTTGG ACGGAAAGCC CAATTTAGAT TACGACGCCG TTTGTCGTCC	780
TTCTGAGCTT CACGCGCTTA AAAAGGGCGC GTTGGATTAT ATTCAGAATT CGGAAAATCA	840
GATATTGTTT ACAATTCATC AGATTTTCGA GTCGTGGATT TTTTCCTCGA AAAAATTGTT	900
GGATCGAATA AGTGAGAGGA TCAGTAAAGA AGAGTTTACC AAAGCAGCAG ATGATTGTTG	960
GATACTGGAG AAAATATGGA AGTTATTGGA GGAAATCGAG AATTTACATT TATTAATGGA	1020
TCCTGACGAT TTCCTGCATC TGAAGACGCA ACTGAGGATG AAAACAGTGG CGGATTCTGA	1080
AACTTTTTGT TTTGATCAA AAGGACTGAT CGAGGTAACA AAATTAAGCA AGGATCTACG	1140
GCACAAGGTG CCGAAGATCC TTGGTGTAGA GGTGGACCCT ATGGGAGGAC CGGTGATACA	1200
AGAGTCGGCA ATGGAGTTGT ACCGAGAAAA AAGAAGATAC GAGAAGATAC ATCTGTTACA	1260
AGCGTTTCAA GGGGTGGAAT CCGCTGTAA AGGGTTTTTC TTTAATTATA AACAGTTGTT	1320
GGTGATCATG ATGGGTAGTT TGGAAGCGAA AGCGAATTTT GCTGTGATTG GTGGTTCTAC	1380
TGAGTCTTCG GATTTGTTGG CTCAGTTGTT TTTAGAACCT ACTTATTATC CGAGTTTGGA	1440
TGGTGCCAAG ACTTTTATTG GTGATTGTTG GGAGCATGAT CAGGCTGTTG GTAGCGGCCT	1500
CGATTGTCGT CATCATCGGA AGAATCGGAC TGCGAAACAA TGATGGTTTC GAAGTTAGTT	1560
TTGGATTGAG TTTGGTTTGA TCTGACTCGG CTGAGTAATG GCGGCGGATA GGGAGGTTAT	1620
GGAGAACGTG GGGCGGAAAG TGGGTGGCCT TGTTAGTGAG ACGTGCAAAC TTTGGTTACT	1680
ATTACATGTG ATATACTTAT ATTTAGTGGG AATATTGCTT TGTGTATATA GATAAATTTT	1740

TGAATTAATT GTTACACTTG TATTAGTAAA TTCT

1774

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 1705 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Beta vulgaris
- (B) STAMM: B883

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

- (A) BIBLIOTHEK: lambdaZAPII
- (B) CLON(E): Bv1832-6b

(viii) POSITION IM GENOM:

- (C) EINHEITEN: 1705

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

ACAAACCACA AAATTACATC TTATCCAATT TTCTCTCTCC TACTATTTAT CTCTCTTCAT	60
CTTCAAATTC AAAACTCAAA ATTTCCAAAA AACATATCAG AAATTCAAAA AAATGGTTGA	120
TTTCGATTGC AAAACAAAAA TGGTTCAATC AACACCAAAT CTCACAAAAA AAAACCCCCAA	180
AACGCATCAC TTCAACGCCG GTAATTCAC CGGTACCGGT AATCGCCGGT GAATTATCAC	240
CGGCATCGGA ATCTTCATGT TTAGCATACG AATCATATCT CCGGTTACCG GAGCTCCGAG	300
AATTATGGAG TTCAAAAGAA TTTCCAGGGT GGAAAACGA GTCAATAATT AAACCGGCTT	360
TACAAGCTTT AGAAATAACT TTCCGGTTTA TTTCAATTAT TTTATCCGAC GCTAGACCGT	420
ACGTGAACCG GCGTGAATGG AATCGTCGAT TGGAGTCGTT AACTCGAGAT CAAGTCGAGT	480
TAATCTCGAT ATTATGTGAA GATGATGAAA CATCTGGTTC TGCTCCCATATA ATGGATCTGA	540
CATCATCTTT CGGTGAAGTG ATGTCACAAA CTGGAAGTTT TACAACAGAA GTATGGAAAC	600
ATGAAACTAC TTCGGTAGTA TGTCGTAGTA GTGAATTTAG TCTACTTCCT AGACTTGCCA	660
CGTGGCATAA ATCAGATGAG ATTTCTTCTA GAATATTCTA CGCGGTTGAG AGCGCGATGA	720
AGAGGTGTCC ATATAGTTTG GGCTTAGGTG AGCCCAATTT AGATGGAAAG CCCAATTTGG	780
ATTACGACGT CGTTTGTCGT CCTACTGAAA TCCACGCGCT TAAAAAAGGC GCGTTGGATT	840
ATATTCAAAA TCCGGAAGAC CAGATTTTAT TCACAATTCA TCAGATTTTC GAGTCGTGGG	900
TTTTTTGCGC GAAACAATTG TTGATTCGTG TAGGAGAGAG AATCAACAAA GAAGAATTCA	960

ACAAAGTTGC AGATGATTGT TGGGTTTTAA CAAGAATCTG GAACATTCTA GAAGAAATCG	1020
AGAATTTACA TTTATTAATG GATCCAGATG ATTTTCTACA TTTGAAAACCT CAATTACGGA	1080
TGAAAACGAC GTCGGATTCT GAAACATTTT GTTTCAGATC AAGAGGTTTA ATTGAAATTA	1140
CAAAATTAAG TAAAGATTTA CGTCACAAAG TTCCAGAAAT TCTAGCCGTT GAAGTGGACC	1200
CCATGGGTGG ACCAGTAATA CAAGAATCAG CAATGGAGTT ATATAGAGAG AAGAGAAAGT	1260
TCGAGAAGAT TCATGTTTTG CAAGCATTTT AAGGTGTTGA ATCTGCTGTG AAAGGTTTTT	1320
TTTATAATTA TAAACAATTG TTGGTGATTA TGATGGGAAG TTTAGAAGCT AAGGCTAATT	1380
TTGCTGTAAT TGGTGGTGGT TCTGAATCGT CTGATTIATT GGCTCAGATC TTTCTAGAAC	1440
CTACTTATTA TCCTAGCTTA GATGGTGCCA AGACTTTTAT TGGTGATTTT TGGGATCATG	1500
ATCAGACGGT TGTGAGTGGG TGTGATAGGA AAAATCGGGT TCGGAAAAAT TGATCATTGA	1560
TAAAAGGGCG AAAGTATACT TGGCCGTCCT CCTTAACCAA GTCTGGTTTC GCTCCTGGGT	1620
GATGGTGGTG GTGTCGTTGG TGAGACGTGG GTTACTTTGA TTACTTGTTA CAATGTGATG	1680
ATATATTTAG TGGAATACTA TTGCT	1705

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 1490 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Arabidopsis thaliana
- (B) STAMM: Columbia

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

- (A) BIBLIOTHEK: lambdaPRL-2
- (B) CLON(E): 61c11t7

(viii) POSITION IM GENOM:

- (C) EINHEITEN: 1490

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

ACAAACACAA ACACACACAC CAAAAAAAC ACAGACCTTA AAAAAATAAA AATGGTTGAT	60
ATGGATTGGA AGAGGAAGAT GGTATCATCA GATTIACCAA ACTCACCTAA GCTTTCTTCA	120
AAGCTTCACG TAACTATTCC ATCACCGTTC AAAATCGTCC CTGTTTCATC TCCGATCTCA	180
TGTTTCAGCAC CTGCTCTTTG CTCTGCTTAC GAGCTTTACC TTCGTCTCCC TGAGCTAAGA	240
AAGCTCTGGT CATCTCGTGA TTTTCCTCAA TGGACATCAG AGCCGATTCT CAAACCAGCT	300

CTTCAAGCTT TGGAGATCAG TTTCAGATTA GTTTTGCGCCG TTTGTTCTGA TACTAGACCG	360
TACATCAACC ACCGTGAATG GAACCGGAGG CTAGATTCTC TCATCACGAA GCAGATCCAG	420
CTTGTAGCAG CGATCTGCGA AGATGAAGAA GAAGAAGGTA TATCAGCGGA GGCTCCGGTC	480
GGCGGTGGAC GGAGTTCGTT GAGTTTGTTA CCGCAGCTAG CTACGTGGAG GAGATCAGAG	540
GCTTTGGGGA AGAAGATCTT ATATACGATC GATAACGAGA TGAGTCGGTG TAAGTACACG	600
CTCGGACTCG GTGAACAAAA CATCGCCGGA AAACCAAATC TCCGGTACGA TCGGATTTGC	660
CGACCAAACG AGATCTATAG CCTCAAGGAT AATCCATACG CAGATCATAT CGATAATCAC	720
GAGAATCAAA CTCTCTATAT CATTCAACCAG ATCCTCGAAT CGTGGATCTA CGCATCTGGA	780
AATCTTCTGA ATCGAATCGT CTCAAGTATC GAAGAAGAGA AATTCGGAAG AGCTTCAAAC	840
GATGTTTACT TGCTGGAGAA GATCTGGAAG ATTTTAGCGG AGATTGAAGA TCTTCATATG	900
TTGATGGATC CGGAAGATTT TTTGAAATTG AAGAAACAGT TACAGATCAA ATCGACGGGT	960
AAAAACGATG CGTTTTGTTT CAGATCTAAA GGATTAGTGG AGATGATGAA GATGTCGAAA	1020
GATCTGAGAC AGAAAGTACC GGCGGTCTTG GCGGTTGAGG TAGATCCAAC CGGAGGACCA	1080
AGATTACAAG AGGCGGCGAT GAAGCTTTAC GCGAGGAAGA CAGAGTGGCA TAAGATTCAT	1140
TTGCTTCAGG GGATGCAAGC GGTGGAAGCG GCGGCGAAGA GTTCTTCTT TGGGTATAGG	1200
CAGTTAGTGG CGGCTATGAT GGAAGTGCG GAGATGAACG CGACGGCGAG TCAAGAGTCG	1260
TGTGACTCAC TGAGTCAGAT ATTTATGGAG CCGACGTATT TCCCGAGCCT TGACGCGGCA	1320
AAGACGTTTC TGGGAGAGTT TTGGAGTCAT TTGGGATGAT TAAATTTTAA TTTCTGCTGG	1380
TATAATTATT TAATATAAAT TTAAATTGGT GGTGTTGTTT AATTTAGTTT GTAAGATAGT	1440
GAAATTTTTC GAACATTTGA CGATCCATAT TTGAATACAA ATTCATTTT	1490

Patentansprüche

1. Nukleinsäure, die in Pflanzen, vorzugsweise der Familien der Solanaceae und/oder Chenopodiaceae und/oder der Brassicaceae, besonders bevorzugt der Gattung Beta und/oder Brassica und/oder Solanum, eine Resistenz gegen sedentäre Nematoden induziert.
2. Nukleinsäure gemäß Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie eine translatierte Sequenz umfaßt, die zu der proteinkodierenden Sequenz des Hs1<sup>pro-1</sup>-Gens aus B. procumbens zu mindestens 60 % homolog ist.
3. Nukleinsäure gemäß Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß das HS1<sup>pro-1</sup>-Gen die folgende Sequenz umfaßt:

```

ATGAGAAGGT
GTGGGTATAG TTTGGGCCTT GGTGAGCCCA ATTTGGACGG AAAGCCCAAT
TTAGATTACG ACGCCGTTTG TCGTCCTTCT GAGCTTCACG CGCTTAAAAA
GGGCGCGTTG GATTATATTC AGAATTCGGA AAATCAGATA TTGTTTACAA
TTCATCAGAT TTTCGAGTCG TGGATTTTTT CCTCGAAAAA ATTGTTGGAT
CGAATAAGTG AGAGGATCAG TAAAGAAGAG TTTACCAAAG CAGCAGATGA
TTGTTGGATA CTGGAGAAAA TATGGAAGTT ATTGGAGGAA ATCGAGAATT
TACATTTATT AATGGATCCT GACGATTTCC TGCATCTGAA GACGCAACTG
AGGATGAAAA CAGTGCGGGA TTCTGAAACT TTTTGTTTTT GATCAAAAGG
ACTGATCGAG GTAACAAAAT TAAGCAAGGA TCTACGGCAC AAGGTGCCGA
AGATCCTTGG TGTAGAGGTG GACCCTATGG GAGGACCGGT GATACAAGAG
TCGGCAATGG AGTTGTACCG AGAAAAAGA AGATACGAGA AGATACATCT
GTTACAAGCG TTTCAAGGGG TGGAATCCGC TGTTAAAGGG TTTTCTTTA
ATTATAAACA GTTGTTGGTG ATCATGATGG GTAGTTTGA AGCGAAAGCG
AATTTTGCTG TGATTGGTGG TTCTACTGAG TCTTCGGATT TGTTGGCTCA
GTTGTTTTTA GAACCTACTT ATTATCCGAG TTTGGATGGT GCCAAGACTT
TTATTGGTGA TTGTTGGGAG CATGATCAGG CTGTTGGTAG CGGCCTCGAT
TGTCGTCATC ATCGGAAGAA TCGGACTGCG AAACAATGA

```

4. Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie eine DNA, vorzugsweise eine cDNA, ist.

5. Nukleinsäure gemäß Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie eine genomische DNA ist, die die folgende Sequenz umfaßt:

```

TCTAGAGCTG TCGACGCGGC CGCGGAATTA ACCCTCACTA AAGGGAACGA
ATTCGGATCT TCTTTCTTGG TGCTTAATTT TTTGACACTA ATCCGATTCT
TAGCATTAAAG TTGAAGCACA CTCTTGATAA ACTATGTTAC TATGTATCAT
TGTCAAATATG CTAAGAATTT GTCTTGACCT CATCGCTATG TATAAGCATC
TAATACTTTC CTAAACTAGT AAAAACAAAT ATTCCATCCG TCCCATAATA
TGAGTCCCTT TTCTATTTTA GGAGTCAAAA TTTTAAAATT TTTGACCAAA
TATTCTTATT ACTATATATA AAAACATATT CATGTGGGAT CTTGTTAGAT
TCGTCTTAAT ATGTATTTTC ATAATATCAA CTTTTTATAT TTTTTTACTA
ATACGAAATT GAAGATATAC AATGTCTTAA AGACTATGCA AAAGTAAGCA
GAACCTATAT TTTGGGACGG AGGGAGTAAT AAGTAATATT GATTGACGCA
TAATTTGTAT ATAAATATTT CAAATTGATA CTACTTTAAA TAATATAGTT
AATGCTTATA AATAAGCCTA AAGACTGTGA ATAGCAAGAT CGTTAAAAAT
AAAATTTGAA AATATTTGAT ATGGATAATG AAATTGGAAA TGGCATGCTT
AGCTTCTCGG GAATCTTATA CCGCTACATC TATAATAAAA ATTCCTCATA
AAATTTTGCC CATTTTAACA CACGAAATTC GTCCTTTTAC GCGAGCCCTT
TCCACACGTC TTAAAAATTT AAAAACCTCG TCTTTACTCT CCCCACCTAT
ATATATACAC GTCCCCCCTT CTCTACTTCC CATCTCACAT ACACATACCC
AATCCACAAA CTTCCATCTT ATCCAACCTT CTCTCACCTA TCTCCTTCTT
CAATTTTCAA AACTCAAAAG AAAATGGTAG ATTTGATTG CAAAACAAAA
ATGGTACAAT CAACACCAAA CCTCACAAAA AAATCTCCAA AAATCACAAC
CAAAACGACA ATATCAACAC CATTAATTTT ACCAGTACCA GTAATTTCCG
GCGAATTATC TCCGGCGTCG GAATCATCCT GTTCAGCTTA CGAATCGTAT
CTCAAAATTAC CGGAGCTCCG TCAACTATGG AGTTCAAAAAG AATTCCCCGG
TTGGGATAAC GAACCGATAA TCAAAACCGG TTTGCAAGCA TTAGAGATAA
CATTCCGGTT CATCTCACTC GTTTTATCCG ACGCTAGACC GTACATAAAC
CGGCGAGAAT GGAACCGGAA ATTAGAGTCG TTAGCGAGAG ATCAAGTCCG
AAACTCATCT CAGTTCTCTG CGGAAGACGA TGAGACACGT GGATCAGCTC
CGAATCGTTG ATCTGACGTC ATCGTATGGT GAGGTGATGT CACAAACAGA
AGTTCAGCGG AGGTATGGAA GCTTGCGAAT GGAGAACATG ATACTACCGT
GGTCTGTCGT AGTAGCGAAT TTAGTCTCCT TCCGAGGTTA GCCACGTGGC
AGAAGTCGGA GGAGATTGCT TCTAGAATCT TCTACGCGGT TGAATCTGCT
ATGAGAAGGT GTGGGTATAG TTTGGGCCTT GGTGAGCCCA ATTTGGACGG
AAAGCCCAAT TTAGATTACG ACGCCGTTTG TCGTCCTTCT GAGCTTCACG
CGCTTAAAAA GGGCGCGTTG GATTATATTC AGAATTCGGA AAATCAGATA
TTGTTTACAA TTCATCAGAT TTTGAGTCG TGGATTTTTT CCTCGAAAAA
ATTGTTGGAT CGAATAAGTG AGAGGATCAG TAAAGAAGAG TTTACCAAAG
CAGCAGATGA TTGTTGGATA CTGGAGAAAA TATGGAAGTT ATTGGAGGAA
ATCGAGAATT TACATTTATT AATGGATCCT GACGATTTCC TGCATCTGAA
GACGCAACTG AGGATGAAAA CAGTGGCGGA TTCTGAAACT TTTTGTTTTC
GATCAAAAGG ACTGATCGAG GTAACAAAAT TAAGCAAGGA TCTACGCCAC
AAGGTGCCGA AGATCCTTGG TGTAGAGGTG GACCCTATGG GAGGACCGGT
GATACAAGAG TCGGCAATGG AGTTGTACCG AGAAAAAGA AGATACGAGA
AGATACATCT GTTACAAGCG TTTCAAGGGG TGAATCCGC TGTTAAAGGG
TTTTTCTTTA ATTATAAACA GTTGTTGGTG ATCATGATGG GTAGTTTGGG
AGCGAAAGCG AATTTTGCTG TGATTGGTGG TTCTACTGAG TCTTCGGATT
TGTTGGCTCA GTTGTTTTTA GAACCTACTT ATTATCCGAG TTTGGATGGT
GCCAAGACTT TTATTGGTGA TTGTTGGGAG CATGATCAGG CTGTTGGTAG

```

CGGCCTCGAT	TGTCGTCATC	ATCGGAAGAA	TCGGACTGCG	AAACAATGAT
GGTTTCGAAG	TTAGTTTTGG	ATTGAGTTTG	GTTTGATCTG	ACTCGGCTGA
GTAATGGGCG	GCGATAGGGA	GTTTATGGAG	AACGTGGGGC	GGAAAGTGGG
TGGCCTTGTT	AGTGAGACGT	GCAAACTTTG	GTTACTATTA	CATGTGATAT
ACTTATATTT	AGTGGGAATA	TTGCTTTGGT	GTATATAGAT	AAATTTTTGA
ATTAATTGTT	ACACTTGTAT	TAGTAAATTC	TGTATCATGA	TGATTATAAC
ATGAATTTTT	TGTTGTGACT	TTAAATGAGA	TTTATGCTCC	TTAATCCTTA
TTTCACTGAT	ATTATTTTTT	TGTAGTCTGA	GTATAAGTGC	GGAGTTTAAT
CAAGCAAGAG	AAAATAATAG	AAGGTGATTG	CATACTTGGG	TTGGAGATCA
ATATCTAAAA	GATGGTTATG	AAACTATTGT	GAATAACGGA	GTACATGTCC
AACACCACAC	ACGTATGACT	GTGTACCTCT	AATTTACAAA	GAGATTTACA
AAATCTAGAT	GAGTTTGTAT	ATGATCGACA	TTGTCTCTAA	ATGGGAGATA
AGAATTAAAT	CGTGAGGCTC	TTTGCGGCTA	G?TCTTCCGA	ATAAAATAAG
AAACAATGGT	TTACTCTAAT	TCA?TTTTCC	AATTGGCAAA	GTGGCACAAAG
CTTCAATAA?	T?GGCTCTTC	ACAATTGAGT	ATAAAAGAAT	GGGTTAATTA
C?CCGG?CTT	TGAATAAAAT	TAATCCTATT	TAATTGTTTT	TGAAATATTC
TTAAAAATA?	CGTTGTCTAA	TACTTTCCTT	AGTTGGGACC	CGGTTCTGAA
CC?ACTTAAA	TTAATGGGCT	CAATGGCCGC	CTAATTTCCCT	CTTGTTATTT
TTAGCCTTTT	TTTTCCCTTT	TTTCCCTTTA	AAATAACTAT	TTGTTCTCTT
GAATATCTTA	AAATACGTGT	CTATC??CTT	TAGTTGGACC	GTCTGAACATA
TTATTATGCT	ATGCACTATT	CCTTTGTATT	TACCTTTTTT	TTTTTCCTTT
AAATACTATT	GTTCTCATTT	CAATTATATT	CTATTTTTGT	TAAAAAACGG
TCTTAATTTT	TACAACAGTA	AAATTATTGA	TTTTCCCTTCT	ATATTAAAAT
TTGAAAGTGA	ATGTATTTTCG	AAATTTAGGT	ATATGAATAT	TTATATTGTT
CGATTAATGA	TGATAAAAGG	ATTTTACTCA	TTAACCTAAA	CCATTTCTAG
ATAAGATAAG	AGGAACTTCC	ACCTAGTTAA	CATGTCTCAC	TTTCCTAGTA
GACGAATCTA	AATTGCGTTG	CTGGATTTAG	AACTTTGGTC	AAGATAATGG
CAAAACCTTC	AAGCACCCGT	AGATGCATTT	TCC?CGACAT	TTCTCATACA
GCACTAAACG	TTTCAACTTC	CTCTTTTATT	TTCTTGAAAT	TTTTTGTGGC
AATGAGAAAC	GTTCGAAGTT	GATCTTTGCG	TTTCGACGAT	TTGAAATAAG
AAAAATGCGTA	TTGTGCGCAA	CTGATTGTAG	TAGTTGC?GT	TATTATAATG
ATAGTCTTTT	ATATAGAATT	CATTTAATTC	TAATTCATTT	GAATCCAGTT
AAGTTGAGTT	TAGTTTAGTC	AGCCTAAAAG	AACAAAGTAA	GTCATGGAAT
GGAATGAAGA	TGTAATCAAA	TAGAGGAGGG	GCTGATAACA	ATAATTATTA
CTTATGTTGC	GTGTTCAATT	CAGTAATGAA	AAAAATAAGG	TTGAATTAGG
AGGGTAATAC	AATTATTACC	GGTGATGTGA	TAAAACTAAT	GTTTAAGGGT
TTAAGTTACT	CTAAACCCCTC	AATTAAACAT	AGTCTAACAA	AAAATTCTCA
TAATCTAAAT	CAAACACGTA	CTTATACAAT	CCTCTACATG	AATCCGTTTC
TAACTCTAAA	GGAAGATCGA	TACTTATTAG	AATCCGTTTC	CAACCCTAAA
AATGACTGAT	CAAAGGTTCA	TGGATTTTGG	AAGGGAAAGA	CGAATGCGAG
GGCAGTGATC	AGGATAATGT	GCATGAGATG	GCAAGGGTCA	TGCTAGTTAG
AGCAAAATAT	A?ATGACTTA	ATTCAAAAAC	TACCTACTAT	TTCAAAATTAA
TAGACTTTAT	TGGAGTCATG	AAGTGTAATG	TTTGGTACAC	CCCACATTAC
TCATGCACTA	CACCTAATTT	GTCACAGCAT	TCAGCTGCCC	TTGTTTTGCA
TCTTTTGGAG	CTGGCGTGCC	TCTTGTGCT	GGTTAGTCGG	CGCTTGGTCT
GTTGTG??GT	GACCCTCTGT	TTTTTTTTTT	TTTTAAAATG	GTCGCTGATT
ACTAT?CTGT	GTATT?CATT	TTGTACTCCC	TCGTATCCAA	TTATATGCTA
CACCTTTTTT	GCGGACTCCA	AAACGTTTTT	TTTTT?TGTC	CGAGAGATAG
AGAGGAAAAG	CCCATGTTGT	TAGGAGAGAG	?TCGGGAGAA	GGAAAAGCCA
AATAAAGAAG	TAATAACATC	TAAATAAGAA	AATTCCTTTG	ATGGAAAGTG
TAGCGACTAA	AAAACGAAGG	ACAATATGTA	GTTTTTCATAT	GCCTTTACCT
TTGCAATCTC	CTTTTTTTATT	GTTTACCCAT	ACTGGATTAG	GTTGGATTTA
TCAACACAAA	ATGAGTTGGA	CTATATCACT	ACATTACTGT	GGTCCTGTGG



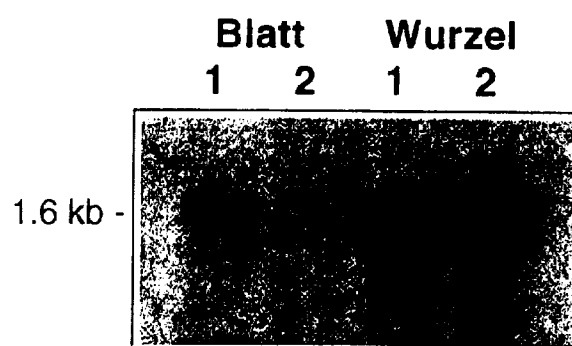
ATACATCAAC AAAAAAATG AGTTGGACCA TATCAATGTG TTAGCGTGGA  
 TTATGTACAC ATTGGACTGG AGTTGAAGCA AATATAATCT GAAAAGGGCG  
 ATGGGTTAGG TCATGAGGTA TTTAGAATAA GACTTTGATC AAGCCCAAAT  
 CCACCCGCAA AGAATTATAC CCTTTATTTT CAAGGCACCA TCACTGCATA  
 AAATAATCTG AAATGCCACA AAAGATTAAC GTCCAATATG CTCACAGCCA  
 AAAATCAATC CATTATTGTT TGGTAAGAAA AGGTAATAGG CTAGATCAAT  
 TTGCTGCCAA TTGCCAGGCC TGTGGGCCTG TCACCTGTGG GTAATTTAAT  
 ATG?CTCAA TGGGTCGGCC TGTTAAGTAC ACCAACATGA ACTTAAAGCT T

6. Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 5, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie erhältlich ist durch Absuchen einer DNA-Bank mit einer DNA-Sequenz wie in Anspruch 3 und/oder 5 angegeben.
7. Nukleinsäure gemäß einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie einer Wildart der Sektion Procumbentes der Gattung Beta entstammt.
8. Nukleinsäure gemäß einem oder mehreren der vorgehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie eine Resistenz gegen sedentäre Nematoden der Gattungen Meloidogyne, Heterodera und/oder Globodera induziert.
9. Nukleinsäure gemäß einem oder mehreren der vorgehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie eine Resistenz gegen Heterodera schachtii induziert.
10. Nukleinsäure gemäß einem oder mehreren der vorgehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie eine Resistenz gegen sedentäre Nematoden in Pflanzen der Art Beta vulgaris induziert.
11. Vektor, enthaltend eine Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 10.
12. Vektor nach Anspruch 11, **dadurch gekennzeichnet**, daß er ein YAC-Vektor ist.

13. Verwendung einer Nukleinsäure und/oder eines Vektors gemäß einem oder mehreren der vorgehenden Ansprüche zur Induktion einer Resistenz gegen sedentäre Nematoden in Pflanzen.
14. Transgene Pflanze, enthaltend eine Nukleinsäure und/oder einen Vektor gemäß einem oder mehreren der vorgehenden Ansprüche.
15. Transgene Pflanze gemäß Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß sie der Gattung Beta oder der Gattung Brassica angehört.
16. Transgene Pflanze gemäß Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß sie Beta vulgaris angehört.
17. Zelle, Samen oder Pflanzenteile, enthaltend eine Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 10 und/oder einen Vektor nach einem der Ansprüche 11 oder 12.
18. Protein, kodiert durch eine Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 10.
19. Protein, erhältlich durch Expression einer Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 10 in einem geeigneten Wirt, wobei das Protein eine Resistenz gegen sedentäre Nematoden in Pflanzen hervorrufen kann.
20. Testkit, enthaltend eine Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 10 und/oder einen Vektor nach einem der Ansprüche 11 oder 12 und/oder ein Protein nach Anspruch 18 oder 19.

21. Verfahren zur Herstellung einer Pflanze, **dadurch gekennzeichnet**, daß eine Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 10 in eine Pflanzenzelle eingebracht wird und eine Pflanze aus der Pflanzenzelle regeneriert wird.
22. Verfahren zum Erzeugen einer Nematodenresistenz in Pflanzen, **dadurch gekennzeichnet**, daß eine Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 10 in eine nematodensensitive Pflanze eingebracht wird.
23. Wurzelspezifischer Promotor, erhältlich durch Absuchen einer Genbank mit der Sequenz, wie in Anspruch 5 angegeben, und Derivate davon mit gleicher Promotoraktivität.
24. Promotor nach Anspruch 23, **dadurch gekennzeichnet**, daß er die Expression des  $HS1^{pro-1}$ -Gens kontrolliert.
25. Promotor, dadurch gekennzeichnet, daß er auf dem ca. 1,5 kb XbaI-Fragment der Sequenz 1832.1 gelegen ist, welches sich 5' vom Startkodon in Position 1551 befindet, sowie davon abgeleitete Derivate.
26. Promotor nach einem der Ansprüche 23-25, dadurch gekennzeichnet, daß er eine Resistenz gegen Heterodera schachtii in Arabidopsis induzieren kann.
27. Verwendung des Promotors gemäß einem der Ansprüche 23 bis 26 für die Expression von Genen.
28. Verwendung der Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1 bis 10 und/oder des Promotors nach einem der Ansprüche 23 bis 26 zur Herstellung nematodenresistenter Pflanzen.
29. Primer für die PCR, erhältlich aus der Sequenz Nr. 1832.1.

Fig. 1



FIGUR 2

```

TCTAGAGCTG TCGACGCCGG CCGGCCAATT AACCCTCACT AAAGGGAACG AATTCGGATC
TTCTTTCTTG GTGCTTATTT TTGACACTAA TCCGATTCTT AGCATTAAAGT TTGAAGCACA
CCTCTTGATA AACTACGTTA CTATGTATCA TGTCAATATG CTAAGAATTT GTCTTGACCT
CATCGCTATG TATAGCATCT ATACTCTAAA CCTAGTAAAA CAAATATCCC ATCCGTCCCA
TAATATGAGT CCCCTTTCTA TTTTAGGAGT CAAAATTTTA AAATTTTGA CCAAATATTC
TTATTACTAT ATATAAAACA TATTCATGTG GGATCTTGTT AGATTCTGCT TAATATGTAT
TTCATAATAC TAACTTTTTA ATATTTTTTT TACTAATACG AAATTGAAGA TATACAATGT
CTTAAATACT ATGCAAAAGT AACAGAACCT ATATTTTTTG GTCCGAGGGA GTAATAACGT
AACCATTGAT TGACGCATAA TTTGTATATA AATATTTTCA AATTGAATCA TCTTAAATAA
TATAGTTAAT GCTTATAAAT AAGCCTAAAG ACTGTGAATA GCAAGATCGT TAAAAATAAA
TTGAAGAAAA TATTTGATAT GGATAATGAA ATTGGAAATG GCATGCTTAG CTTCTCGGGA
ATCTTATACC GCTACATCTA TAATAAAAAAT TCCTCATAAA ATTTTGCCCA TTTTAAACACA
CGAAATTCGT CTTTTTACGC GAGCCCTTTC CACACGTCTT TAAAATTTAA AAACCTCGTC
TTTACTCTCC CCACCTATAT ATATACACGT CCCCCCTTCT CTACTTCCCA TCTCACATAC
ACATACCCAA TCCACAACT TCCATCTTAT CCAACTTTC? CTCACCTATC CCCTTCTTCA
ATTTTCCAAA ACTCAAACA AAATCAAAGA AATGGTAGAT TCCAAAACAA ACAAAATGGT
ACAATCAACA CCAAACCTCA CAAAAAATC TCCAAAATC ACAACCAAAC GCACAATTAT
CAACACCATT AATTTCCCCA GTACCAGTAA TTTCCGGCGA ATTATCTCCG GCGTCGGAAT
CATCCTGTTT AGCTTACGAA TCGTATCTCA AATTACCGGA GCTCCGTCAA CTATGGAGTT
CAAAAGAATT CCGCGTTGG GATAACGAAC CGATAATCAA ACCGGCTTTG CAAGCATTAG
AGATAACATT CCGGTTTCATC TCACTCGTTT TATCCGACGC TAGACCGTAC ATAAACCGGC
GAGAAATGGAA CCGGAAATTA GAGTCGTTAG CGAGAGATCA AGTCCGAAAC TCATCTCAGT
TCTCTGCGGA AGACGATGAG ACACGTGGAT CAGCTCCGAA TCGTTGATCT GACGTCATCG
TATGGTGAGG TGATGTCACA AACAGAAGTT CAGCGGAGGT ATGGAAGCTT GCGAATGAG
AACATGATAC TACCGTGGTC TGTCGTAGTA GCGAATTTAG TCTCCTTCCG AGGTTAGCCA
CGTGGCAGAA GTCGGAGGAG ATTGCTTCTA GAATCTTCTA CGCGGTTGAA TCTGCTATGA
GAAGGTGTGG GTATAGTTTG GGCCTTGGTG AGCCCAATTT GGACGGAAG CCCAATTTAG
ATTACGACGC CGTTTGTCGT CTTTCTGAGC TTCACGCGCT TAAAAGGGC GCGTTGGATT
ATATTGAGAA TTCGGAATTA CAGATATTGT TTACAATTCA TCAGATTTTC GAGTCGTGGA
TTTTTCTCTC GAAAAAATTG TTGGATCGAA TAAGTGAGAG GATCAGTAAA GAAGAGTTTA
CCAAAGCAGC AGATGATTGT TGGATACTGG AGAAAATATG GAAGTTATTG GAGGAAATCG
AGAATTTACA TTTATTAATG GATCCTGACG ATTTCTGCA TCTGAAGACG CAACTGAGGA
TGAAAACAGT GGCGGATTCT GAAACTTTTT GTTTTCGATC AAAAGGACTG ATCGAGGTAA
CAAAATTAAG CAAGGATCTA CGGCACAAGG TGCCGAAGAT CCTTGGTGTA GAGGTGGACC
CTATGGGAGG ACCGGTGATA CAAGAGTCGG CAATGGAGTT GTACCGAGAA AAAAGAAGAT
ACGAGAAGAT ACATCTGTTA CAAGCGTTTC AAGGGGTGGA ATCCGCTGTT AAAGGGTTTT
TCTTTAATTA TAAACAGTTG TTGGTGATCA TGATGGGTAG TTTGGAACCG AAAGCGAATT
TTGCTGTGAT TGGTGGTTCT ACTGAGTCTT CGGATTTGTT GGCTCAGTTG TTTTLAGAAC
CTACTTATTA TCCGAGTTTG GATGGTGCCA AGACTTTTAT TGGTGATTGT TGGGAGCATG
ATCAGGCTGT TGGTAGCGGC CTCGATTGTC GTCATCATCG GAAGAATCGG ACTGCGAAAC
AATGATGGTT TCGAAGTTAG TTTTGGATTG AGTTTGGTTT GATCTGACTC GGCTGAGTAA
TGGGCGGCGA TAGGGAGGTT ATGGAGAACC TGGGGCGGAA AGTGGGTGGC CTTGTAGTG
AGACGTGCAA ACTTTGGTTA CTATTACATG TGATATACTT ATATTAGTG GGAATATTGC
TTTGGTGTAT ATAGATAAAT TTTTGAATTA ATTGTTACAC TTGTATTAGT AAATTCTGTA
TCATGATGAT TATAACATGA ATTTTTTGTT GTGACTTTAA ATGAGATTTA TGCTCCTTAA
TCCTTATTTT ACTGATATTA TTTTTTTGTA GTCTGAGTAT AAGTGCAGGAG TTTAATCAAG
CAAGAGAAAA TAATAGAAGG TGATTGCATA CTTGGATTGG AGATCAATAT CTAAGAGATG

```

## FIGUR 2 - Fortsetzung

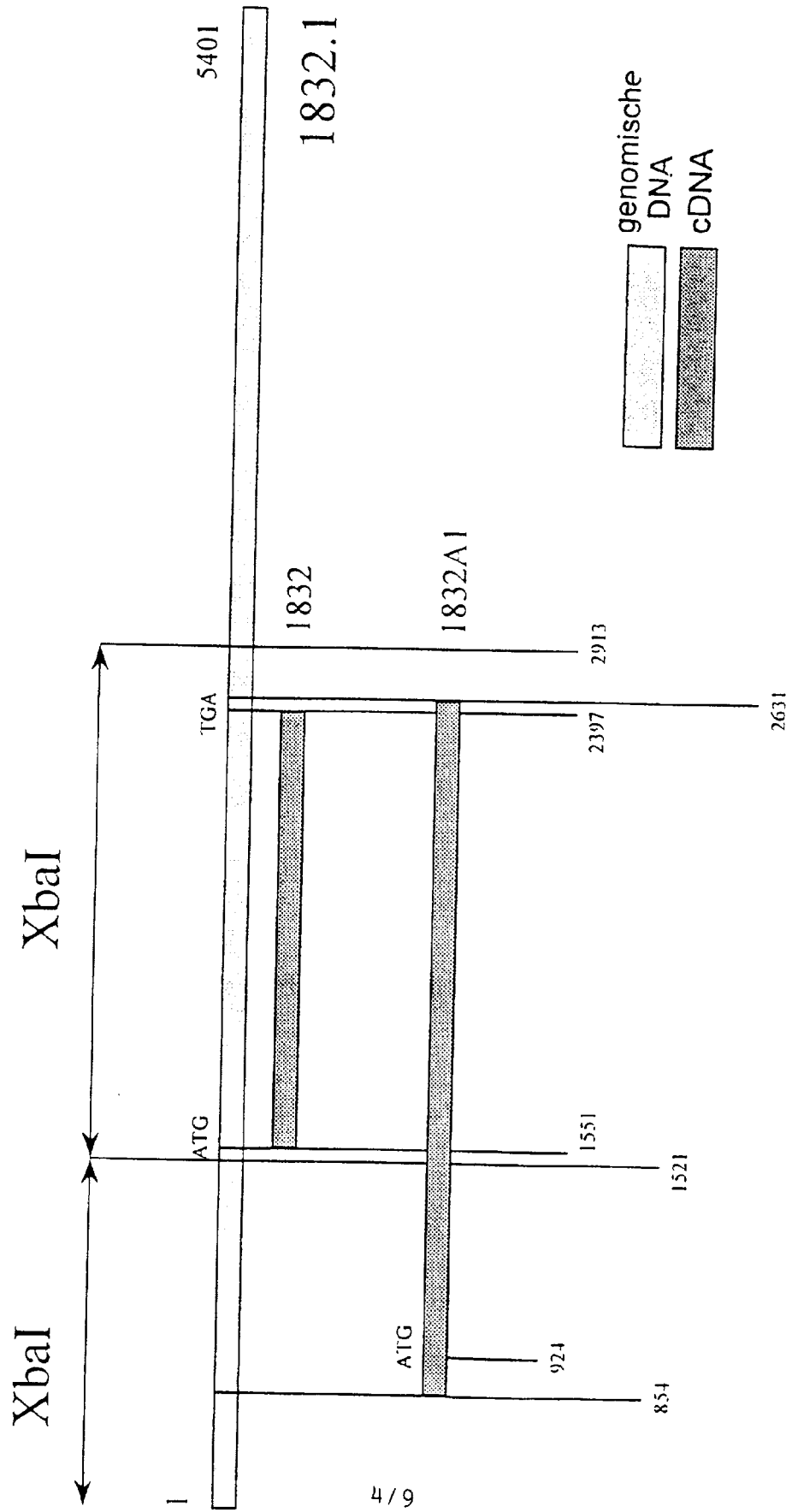
```

GTTATGAAAC TATTGTGAAT AACGGAGTAC ATGTCCAACA CCACACACGT ATGACTGTGT
ACCTCTAATT TACAAAGAGA TTTACAAAT CTAGATGAGT TTTGATATGA TCGACATTGT
CTCTAAATGG GAGATAAGAA TTAAATCGTG AGGCTCTTTG CGGCTAG?TC TTCCGAATAA
AATAAGAAAC AATGGTTTAC TCTAATTCA? TTTTCCAATT GGCAAAGTGG CACAAGCTTC
AATAA?T?GG CTCTTCACAA TTGAGTATAA AAGAATGGGT TAATTAC?CC GG?CTTTGAA
TAAAATTAAT CCTATTTAAT TGTTTTTGAA ATATTCTTAA AAATA?CGTT GTCTAATACT
TTCTTTAGTT GGGACCCGGT TCTGAACC?A CTTAAATTAA TGGGCTCAAT GGCCGCCTAA
TTTCCTCTTG TTATTTTAG CCTTTTTTTT CCTTTTTTTC CCTTTAAAAA AACTATTTGT
TCTCTTGAAT ATCTTAAAT ACGTGTCTAT C??CTTTAGT TGGACCGTCT GAACTATTAT
TATGCTATGC ACTATTCCTT TGTATTTACC TTTTCTTTT TCCTTTAAAT ACTATTGTTT
TCATTTCAAT TATATTCTAT TTTTGTTAAA AAACGGTCTT AATTTTACA ACAGTAAAAAT
TATTGATTTT CCTTCTATAT TAAAATTTGA AAGTGAATGT ATTTGAAAT TTAGGTATAT
GAATATTTAT ATTGTTGAT TAATGATGAT AAAAGGATTT TACTCATTAA CCTAAACCAT
TTCTAGATAA GATAAGAGGA ACTTCCACCT AGTTAACATG TCTCCTTTT CTAGTAGACG
AATCTAAAT? GCGTTGCTGG ATTTAGAACT TTGGTCAAGA TAATGGCAAA ACTTTCAAGC
ACCCGTAGAT GCATTTTCC? CGACATTTCT CATAAGCAC TAAACGTTT AACTTCCTCT
TTTATTTTCT TGAAATTTT TGTGGCAATG AGAAACGTTT GAAGTTGATC TTTGCGTTTC
GACGATTTGA AATAAGAAAA TGCGTATTGT CGGCAACTGA TTGTAGTAGT TGC?GTTATT
ATAATGATAG TCTTTTATAT AGAATTCATT TAATTCTAAT TCATTTGAAT CCAGTTAAGT
TGAGTTTAGT TTAGTCAGCC TAAAAGAACA AAGTAAGTCA TGGAAATGGAA TGAAGATGTA
ATCAAATAGA GGAGGGGCTG ATAACAATAA TTATTACTTA TGTTCGCTGT TCAATTCAGT
AATGAAAAAA ATAAGGTTGA ATTAGGAGGG TAATACAATT ATTACCGGTG ATGTGATAAA
ACTAATGTTT AAGGGTTTAA GTTACTCTAA ACCCTCAATT AAACATAGTC TAACAAAAAA
TTCTCATAAT CTAAATCAAA CACGTACTTA TACAATCCTC TACATGAATC CGTTTCTAAC
TCTAAAGGAA GATCGATACT TATTAGAATC CGTTTCCAAC CCTAAAAATG ACTGATCAAA
GGTTCATGGA TTTTGGAAGG GAAAGACGAA TGCGAGGGCA GTGTACAGGA TAATGTGCAT
GAGATGGCAA GGGTCATGCT AGTTAGAGCA AAATATA?AT GACTTAATTC AAAAATACC
TACTATTCA AATTAATAGA CTTTATGGA GTCATGAAGT GTACTGTTTG GTACACCCCA
CATTACTCAT GCACTACACC TAATTGTCA CAGCATTCAG CTGCCCTTGT TTTGCAGTCT
TTGGAGCTGG CGTGCTCTT GTTGCTGGTT AGTCGGCGCT TGGTCTGTTG TG??GTGACC
CTCTGTTTTT TTTTTTTTT AAAATGGTCG CTGATTACTA T?CTGTGTAT T?CATTTTGT
ACTCCCTCGT ATCCAATTAT ATGCTACACT TTTTTGCGG ACTCCAAAAC GTTTTTTTTT
T?TGTCGAG AGATAGAGAG GAAAAGCCCA TGTTGTTAGG AGAGAG?TCG GGAGAAGGAA
AAGCCAAATA AAGAAGTAAT AACATCTAAA TAAGAAAATT CCTTTGATGG AAAGTGATG
GACTAAAAAA CGAAGGACAA TATGTAGTTT TCATATGCCT TTACCTTTGC AATCTCCTTT
TTTATTGTTT ACCCATACTG GATTAGGTTG GATTTATCAA CACAAAATGA GTTGGACTAT
ATCACTACAT TACTGTGGTC CTGTGGATAC ATCAACAAAA AAAATGAGTT GGACCATATC
AATGTGTTAG CGTGGATTAT GTACACATTG GACTGGAGTT GAAGCAAATA TAATCTGAAA
AGGGCGATGG GTTAGGTCAT GAGGTATTTA GAATAAGACT TTGATCAAGC CCAAATCCAC
CCGCAAAGAA TTATACCTT TATTTTCAAG GCACCATCAC TGCATAAAAT AATCTGAAAT
GCCACAAAAG ATTAACGTCC AATATGCTCA CAGCCAAAAA TCAATCCATT ATTGTTTGGT
AAGAAAAGGT AATAGGCTAG ATCAATTTGC TGCCAATTGC CAGGCCTGTG GGCCTGTCAC
CTGTGGGTAA TTTAATATG? CTCAAATGGG TCGGCCTGTT AAGTACACCA ACATGAACCT
AAAGCTT

```

FIGUR 3

Hs1-Genregion



FIGUR 4

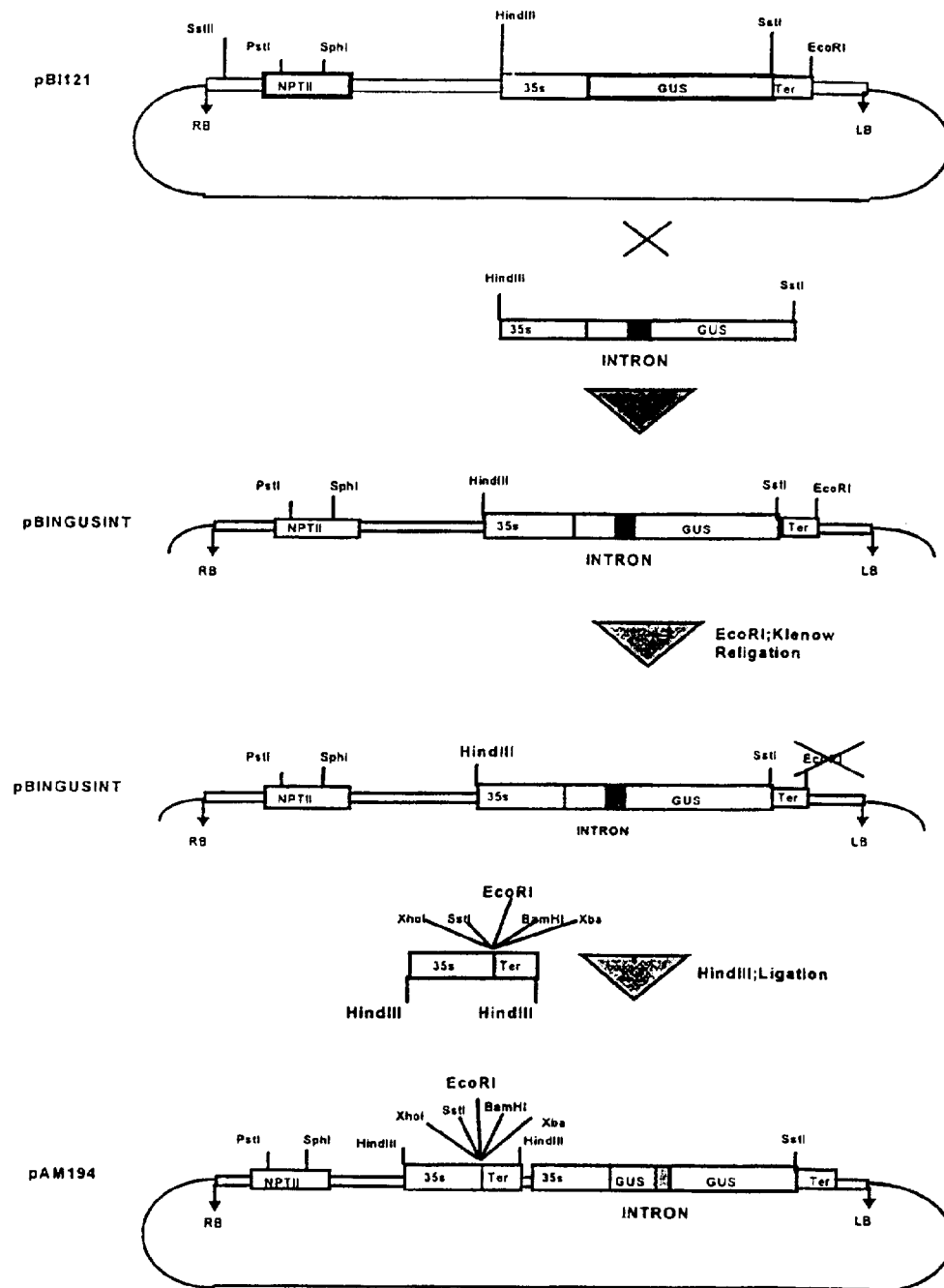
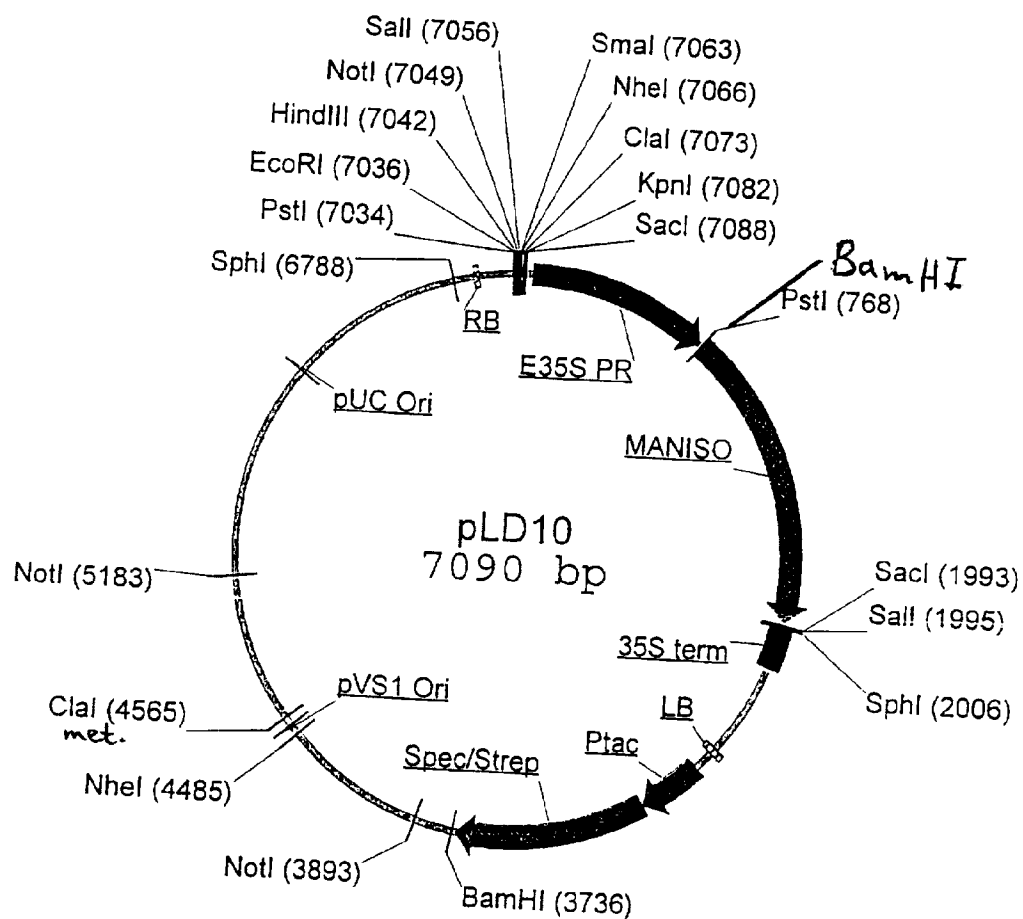


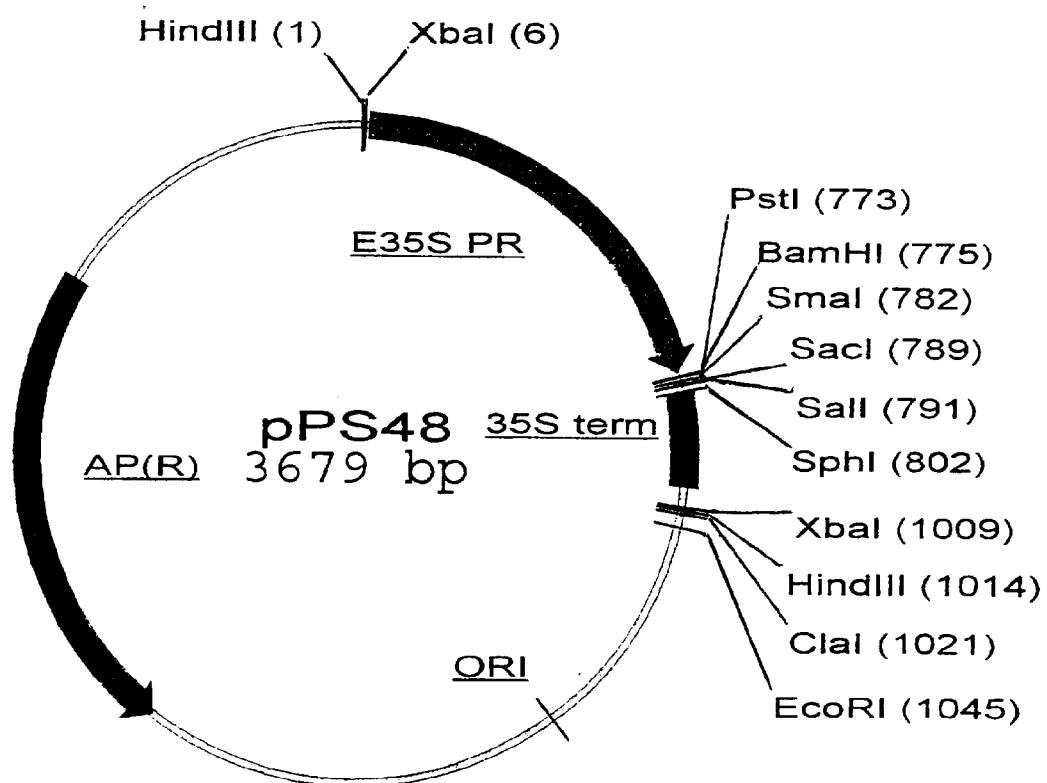
Figure: Physical map of fragments of the vector pAM194



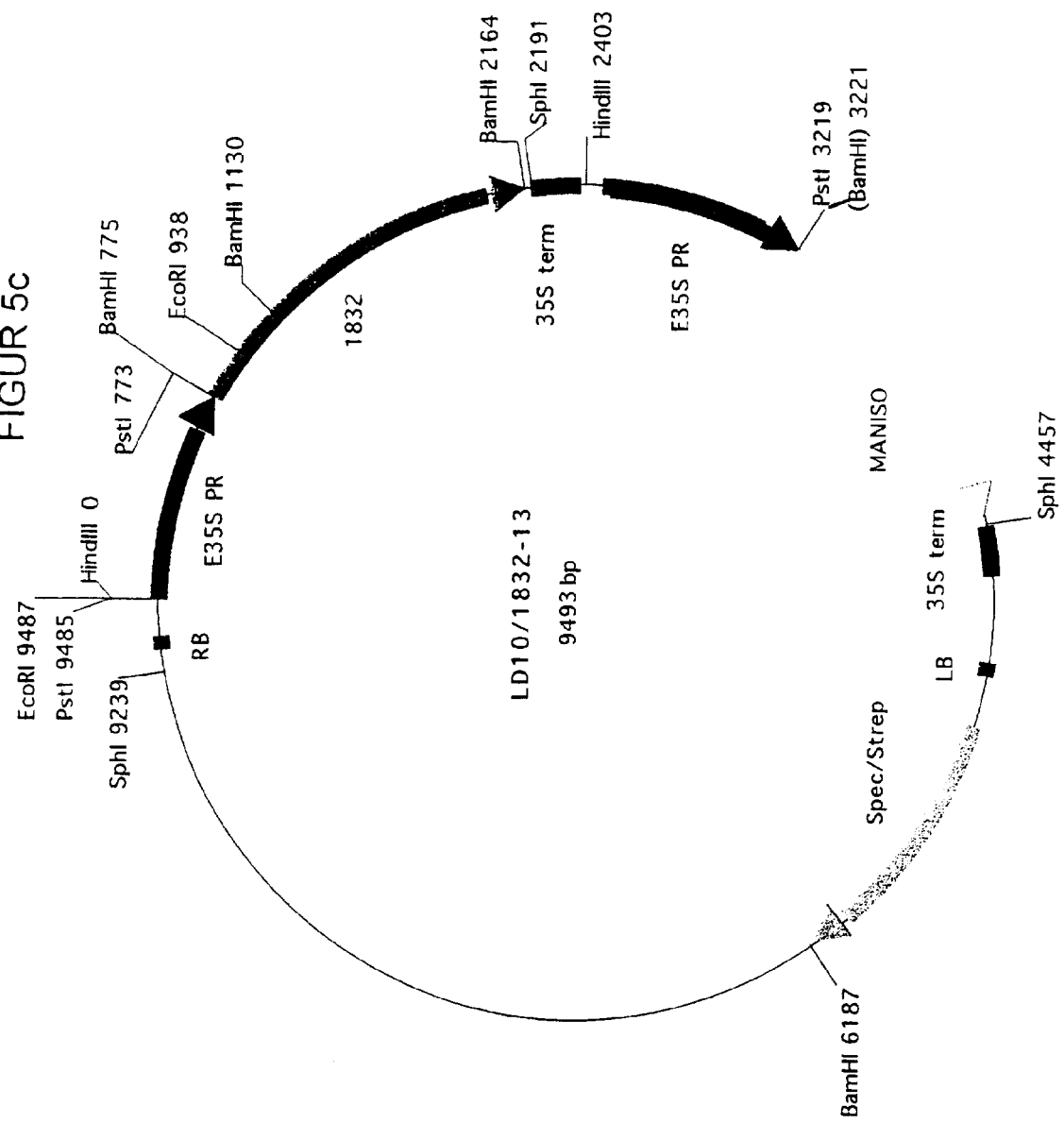
FIGUR 5a

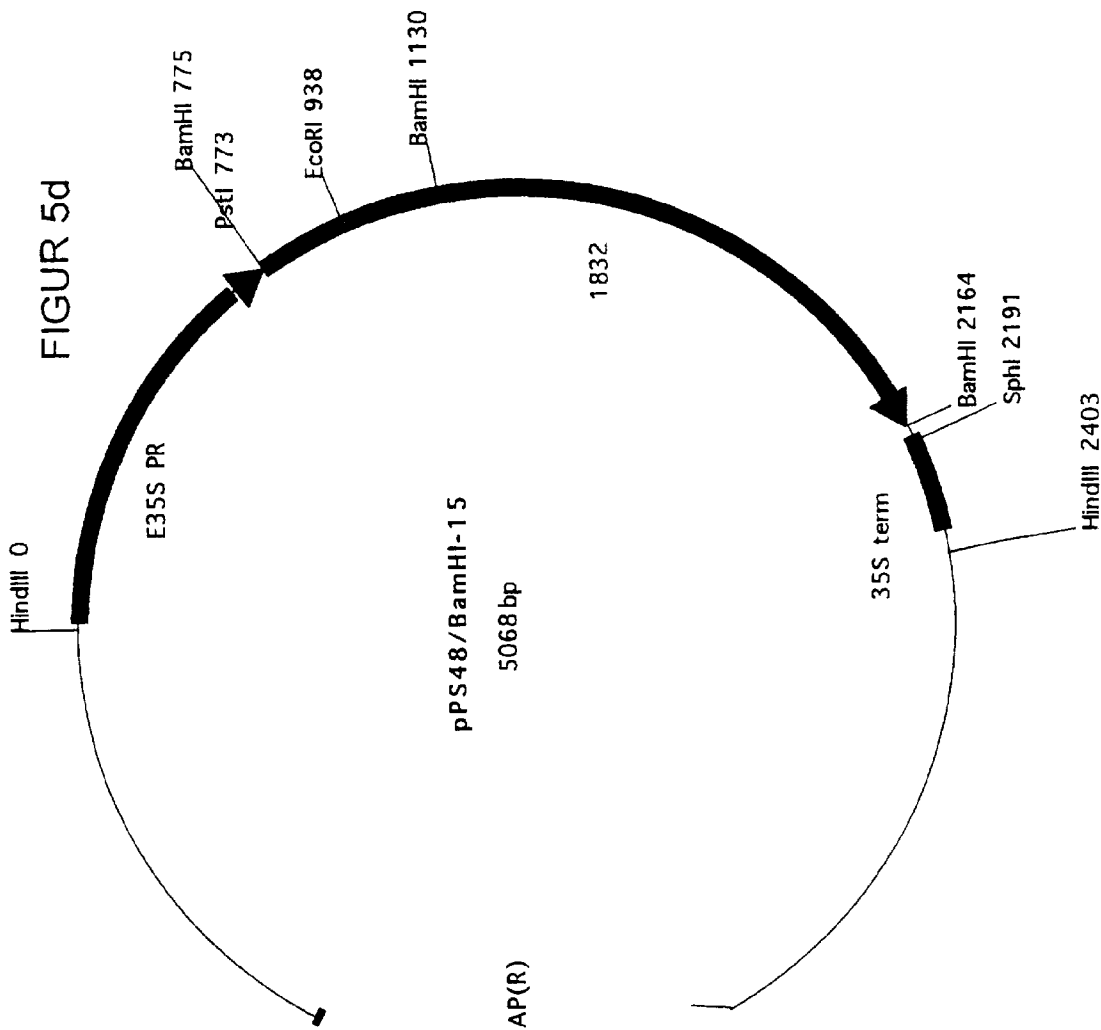


FIGUR 5b



FIGUR 5c





# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 97/05130

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/82 C12N15/29 C07K14/415 C12Q1/68 A01H5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N C07K C12Q A01H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KRENS, F.A., ETAL.: "ENGINEERING NEMATODE RESISTANCE IN SUGARBEET; EXPRESSION OF BETA PATELLARIS GENE ENCODING NEMATODE RESISTANCE IN TRANSGENIC SUGARBEET (CONFERENCE ABSTRACT)" JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY, SUPPLEMENT 13D, 1989, page 337 XP002055586 see the whole document ----- -/--	1,7-17, 21,22,28

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

18 February 1998

Date of mailing of the international search report

05/03/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Holtorf, S

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 97/05130

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JUNG, C., ET AL.: "DNA MARKERS CLOSELY LINKED TO NEMATODE RESISTANCE GENES IN SUGAR BEET (BETA VULGARIS L.) MAPPED USING CHROMOSOME ADDITIONS AND TRANSLOCATIONS ORIGINATING FROM WILD BEETS OF THE PROCUMBES SECTION" MOLECULAR AND GENERAL GENETICS, vol. 232, 1992, pages 271-278, XP002055587 PAGES 271, LINES 33; 272, LEFT HAND COLUMN, 276, RIGHT HAND COLUMN, 277 ---	1,7-13, 17,22,28
X	WO 93 19181 A (SANDOZ AG ;SANDOZ AG (DE); STEEN PER (DK); SANDOZ LTD (CH)) 30 September 1993  PAGES 1-2; 3, LINES 1-20; 10; 13, LAST PARAGRAPH; 24 SECOND PARAGRAPH;35 ---	1,2, 7-12, 17-19, 21,22,28
X	WILLIAMSON V M ET AL: "MOLECULAR TRANSFER OF NEMATODE RESISTANCE GENES" JOURNAL OF NEMATOLOGY, vol. 24, no. 2, June 1992, pages 234-241, XP000653134 see the whole document ---	1,7-17, 21,22,28
X	WEBB D M ET AL: "GENETIC MAPPING OF SOYBEAN CYST NEMATODE RACE-3 RESISTANCE LOCI IN THE SOYBEAN PL 437.654" THEORETICAL AND APPLIED GENETICS, vol. 91, no. 4, September 1995, pages 574-581, XP000604565 PAGES 574, RIGHT HAND COLUMN, 576, RIGHT HAND COLUMN; 579, RIGHTHAND COLUMN, 580; ---	1,8, 11-14, 17,21, 22,28
A	BURROWS P R ET AL: "CELLULAR AND MOLECULAR APPROACHES TO THE CONTROL OF PLANT PARASITIC NEMATODES" PLANT PARASITIC NEMATODES IN TEMPERATE AGRICULTURE, 1 January 1993, pages 609-630, XP002002337 SPECIAL PAGE 615 see the whole document ---	1-29
P,X	CAI,D., ET AL.: "POSITIONAL CLONING OF A GENE FOR NEMATODE RESISTANCE IN SUGAR BEET" SCIENCE, vol. 275, 7 February 1997, pages 832-834, XP002055588 see the whole document ---	1-22,28, 29

-/--

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 97/05130

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	WO 96 30517 A (COMMW SCIENT IND RES ORG ;LAGUDAH EVANS SYLVANUS (AU)) 3 October 1996  PAGES 2-4, 5, LINES 26-30; 9,16,22 ----	1,4,8, 11,13, 14, 17-19, 21,22,28
T	SANDAL, N.N., ET AL . . : "BACKCROSSING OF NEMATODE-RESISTANT SUGAR BEET: A SECOND NEMATODE RESISTANCE GENE AT THE LOCUS CONTAINING Hs1pro-1" MOLECULAR BREEDING, vol. 3, December 1997, pages 471-480, XP002055589 see the whole document -----	1-29

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 97/05130

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9319181 A	30-09-93	AU 3751493 A	21-10-93
WO 9630517 A	03-10-96	AU 5096696 A	16-10-96
		CA 2216799 A	03-10-96
		EP 0817849 A	14-01-98



# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 97/05130

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C12N15/82 C12N15/29 C07K14/415 C12Q1/68 A01H5/00

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12N C07K C12Q A01H

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	KRENS, F.A., ETAL.: "ENGINEERING NEMATODE RESISTANCE IN SUGARBEET; EXPRESSION OF BETA PATELLARIS GENE ENCODING NEMATODE RESISTANCE IN TRANSGENIC SUGARBEET (CONFERENCE ABSTRACT)" JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY, SUPPLEMENT 13D, 1989, Seite 337 XP002055586 siehe das ganze Dokument --- -/--	1,7-17, 21,22,28

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindertischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindertischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

18. Februar 1998

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

05/03/1998

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Holtorf, S

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	JUNG, C. , ET AL.: "DNA MARKERS CLOSELY LINKED TO NEMATODE RESISTANCE GENES IN SUGAR BEET (BETA VULGARIS L.) MAPPED USING CHROMOSOME ADDITIONS AND TRANSLOCATIONS ORIGINATING FROM WILD BEETS OF THE PROCUMBES SECTION" MOLECULAR AND GENERAL GENETICS, Bd. 232, 1992, Seiten 271-278, XP002055587 SEITEN 271, ZEILE 33; 272, LINKE SPALTE, 276, RECHTE SPALTE, 277 ---	1,7-13, 17,22,28
X	WO 93 19181 A (SANDOZ AG ;SANDOZ AG (DE); STEEN PER (DK); SANDOZ LTD (CH)) 30.September 1993  SEITEN 1-2; 3, ZEILE 1-20; 10;13,LETZTER ABSATZ;24 ZWEITER ABSATZ;35 ---	1,2, 7-12, 17-19, 21,22,28
X	WILLIAMSON V M ET AL: "MOLECULAR TRANSFER OF NEMATODE RESISTANCE GENES" JOURNAL OF NEMATOLOGY, Bd. 24, Nr. 2, Juni 1992, Seiten 234-241, XP000653134 siehe das ganze Dokument ---	1,7-17, 21,22,28
X	WEBB D M ET AL: "GENETIC MAPPING OF SOYBEAN CYST NEMATODE RACE-3 RESISTANCE LOCI IN THE SOYBEAN PL 437.654" THEORETICAL AND APPLIED GENETICS, Bd. 91, Nr. 4, September 1995, Seiten 574-581, XP000604565 SEITEN 574, RECHTE SPALTE; 576, RECHTE SPALTE; 579, RECHTE SPALTE; 580; FIG. 2 ---	1,8, 11-14, 17,21, 22,28
A	BURROWS P R ET AL: "CELLULAR AND MOLECULAR APPROACHES TO THE CONTROL OF PLANT PARASITIC NEMATODES" PLANT PARASITIC NEMATODES IN TEMPERATE AGRICULTURE, 1.Januar 1993, Seiten 609-630, XP002002337 SPEZIELL SEITE 615 siehe das ganze Dokument ---	1-29
P,X	CAI,D., ET AL . : "POSITIONAL CLONING OF A GENE FOR NEMATODE RESISTANCE IN SUGAR BEET" SCIENCE, Bd. 275, 7.Februar 1997, Seiten 832-834, XP002055588 siehe das ganze Dokument ---	1-22,28, 29

-/--

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 97/05130

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,X	WO 96 30517 A (COMMW SCIENT IND RES ORG ;LAGUDAH EVANS SYLVANUS (AU)) 3.Oktober 1996  SEITEN 2-4, 5, ZEILE 26-30; 9,16,22 ---	1,4,8, 11,13, 14, 17-19, 21,22,28
T	SANDAL, N.N., ET AL . : "BACKCROSSING OF NEMATODE-RESISTANT SUGAR BEET: A SECOND NEMATODE RESISTANCE GENE AT THE LOCUS CONTAINING Hs1pro-1" MOLECULAR BREEDING, Bd. 3, Dezember 1997, Seiten 471-480, XP002055589 siehe das ganze Dokument -----	1-29

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 97/05130

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9319181 A	30-09-93	AU 3751493 A	21-10-93
WO 9630517 A	03-10-96	AU 5096696 A	16-10-96
		CA 2216799 A	03-10-96
		EP 0817849 A	14-01-98